

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Barbora Dvořáková**

## **Vliv melatoninu na rytmické uvolňování ATP z organotypických kultur SCN potkana**

**The effect of melatonin on rhythmic ATP release from organotypic cultures of the rat  
SCN**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Irena Svobodová, Ph.D.**

Praha, 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 8. 2019

Barbora Dvořáková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala především Ing. Ireně Svobodové, Ph.D., pod jejíž vedením byla práce zpracována. Doktorka Svobodová byla vždy ochotna pomoci, poskytnout věcné připomínky a aktivně se zajímala o zdárné vypracování práce. Také bych ráda vyjádřila velké díky RNDr. Haně Zemkové, CSc., za její vstřícnost při konzultacích a nezastupitelné roli při zpracovávání výsledků.

Nakonec děkuji své rodině.

## **Abstrakt**

Rytmus v akumulaci extracelulárního ATP je jeden z projevů cirkadiánní rytmicity, kterou se řídí fyziologické funkce napříč živočišnou říší. Probíhá v suprachiasmatickém jádře hypotalamu (SCN), které představuje centrum cirkadiánních hodin a závisí na něm rytmicita celého organismu. V této diplomové práci byl studován ATP rytmus v organotypické kultuře a účinek melatoninu, hormonu, jehož syntéza je řízena aktivitou jádra a který je zde schopen zpětnovazebně ovlivnit aktivitu buněk. Ukázalo se, že pod vlivem kontinuální přítomnosti melatoninu je výlev ATP do extracelulárního prostoru statisticky významně snížen, a že velikost této inhibice závisí s přímou úměrou na dávce aplikovaného melatoninu v rozmezí 0,1-10 nM. V případě jednorázové aplikace melatoninu v 16:00 dochází ke zpoždění fáze ATP, nicméně bez výrazného snížení celkového výlevu ATP. Bylo také ukázáno, že pod vlivem tetrodotoxinu, který inhibuje elektrickou aktivitu neuronů, je ATP rytmus inhibován i desynchronizován zároveň, což ukazuje na roli neuronů v regulaci výlevu ATP. Tyto výsledky ukazují, že melatonin je schopen vyvolat zpoždění fáze ATP rytmu v SCN, snížit množství akumulovaného ATP, dále že účinek melatoninu je pravděpodobně zprostředkován specifickými melatoninovými receptory, a že ATP rytmus je pravděpodobně výsledkem vzájemné interakce gliových buněk a neuronů v SCN.

## **Klíčová slova**

melatonin, ATP rytmus, suprachiasmatické jádro, astrocyt

## **Abstract**

The rhythm of ATP accumulation is an one of examples of circadian rhythmicity which is demonstrated across the animal kingdom. It is located in the suprachiasmatic nucleus of hypothalamus, which is a centre of circadian clock and imposes rhythmicity on a whole organism. The question concerning the ATP rhythm in an organotypic culture and the impact of melatonin on it has been discussing in this thesis. The synthesis of melatonin is regulated by the activity of the SCN and the hormon itself is known for its feedback on the SCN and a capability of regulating it. It has been shown that ATP rhythm is significantly inhibited under the constant control of melatonin and this inhibition is dose-dependent on a scale of 0,1-10 nM. In case of one-time applied melatonin in 4 p.m. there is no reduction in the accumulation of extracellular ATP but there is a phase shift in ATP rhythm. It has also been shown that ATP rhythm is inhibited and desynchronized under the control of tetrodotoxin which blocks an electric activity of neurons. These results show that melatonin is capable of inducing phase delay of ATP rhythm in SCN and reducing an amount of extracellular ATP, that the effect of melatonin is probably mediated by specific receptors and lastly that ATP rhythm is a result of cell-cell interaction between neurons and astrocytes.

## **Key words**

melatonin, ATP rhythm, suprachiasmatic nucleus, astrocyte

## Obsah

1. Seznam zkratek .....	1
2. Úvod .....	3
3. Literární přehled .....	4
3.1. Cirkadiánní rytmy .....	4
3.1.1. Charakteristika SCN .....	4
3.1.2. Rytmicita .....	6
3.2. Astrocyty .....	8
3.2.1. Astrocyty v SCN .....	8
3.3. ATP jako signální molekula .....	11
3.4. Rytmická akumulace extracelulárního ATP v SCN .....	13
3.5. Melatonin .....	17
3.5.1. Charakteristika .....	17
3.5.2. Receptory .....	19
3.5.3. Působení melatoninu v SCN .....	20
3.5.4. Interakce melatoninu a astrocytů .....	24
3.5.5. Vliv melatoninu na produkci ATP .....	25
4. Cíle diplomové práce .....	26
5. Materiál a metody .....	27
5.1. Základní informace .....	27
5.2. Organotypické kultury .....	27
5.2.1. Příprava a kultivace organotypických kultur .....	28
5.3. Měření koncentrace ATP .....	28
5.3.1. Bioluminiscenční stanovení hladiny ATP .....	28
5.4. Experimentální design .....	29
5.5. Analýza a statistické zpracování dat .....	29
6. Výsledky .....	30
6.1. Vliv kontinuální přítomnosti melatoninu na rytmus extracelulárního ATP .....	31
6.2. Vliv jednorázové aplikace melatoninu v 16:00 hod. na rytmus extracelulárního ATP .....	34
6.3. Vliv dlouhodobé přítomnosti TTX na rytmus ATP .....	36
6.4. Vliv jednorázové aplikace TTX v 16:00 hod. na rytmus extracelulárního ATP .....	38
7. Diskuse .....	40
8. Závěr .....	46
9. Literatura .....	47

## 1. Seznam zkratek

<b>[ATP]<sub>e</sub></b>	koncentrace extracelulárního ATP	<b>CRE</b>	DNA sekvence vazající CREB (z angl. cAMP response element-binding protein)
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	intracelulární koncentrace kationtů vápníku	<b>CRY</b>	protein hodinového genu <i>Cry</i>
<b>[cAMP]<sub>i</sub></b>	intracelulární koncentrace cAMP	<b>Cry</b>	hodinový gen (z angl. Cryptochrom)
<b>Δψ<sub>m</sub></b>	mitochondriální membránový potenciál	<b>CT</b>	cirkadiánní čas
<b>4P-PDOT</b>	4-fenyl-2-propionamidotetralin	<b>DD/LD cyklus</b>	označení povahy vnějších světelných podmínek; vyjádřeno poměrem světelné a temnostní periody v rámci 24hodinového cirkadiánního cyklu (z angl. DD = dark-dark; LD=light-dark)
<b>A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub></b>	adenosinové receptory typu 1,2A,2B a 3	<b>DM</b>	dorsomediální
<b>AANAT</b>	aralkylamin N-acetyltransferáza	<b>EAAT</b>	transportér pro glutamát (z angl. Excitatory Amino Acid Transporter)
<b>ADP</b>	adenosin-5'-difosfát	<b>GABA</b>	kyselina γ-aminomáselná (z angl. Gamma-AminoButyric Acid)
<b>ASMT</b>	acetylserotoninmethyltransferáza	<b>GRP</b>	gastrin uvolňující peptid (angl. Gastrin-Releasing Peptide)
<b>ATP</b>	adenosin-5'-trifosfát	<b>IP3</b>	inositol-1,4,5-trifosfát
<b>AVP</b>	arginin vasopresin	<b>mRNA</b>	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. Messenger Ribonucleic Acid)
<b>AVP</b>	gen pro arginin vasopresin	<b>MT1 a MT2</b>	receptory pro melatonin typu 1 a 2
<b>BMAL1</b>	protein hodinového genu <i>Bmal1</i>	<b>MT1/2 KO</b>	knockout receptoru MT1/2
<b><i>Bmal1</i></b>	hodinový gen (z angl. Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Like protein)	<b>NAS</b>	N-acetylserotonin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	dvojmocné kationty vápníku	<b>NMDA</b>	N-methyl-D-asparagová kyselina
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát	<b>NMS</b>	neuromedin S
<b>CFTR</b>	typ ABC proteinu (angl. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)	<b>P2X<sub>1-7</sub></b>	ionotropní purinergní receptory typu 1-7
<b>cGMP</b>	cyklický guanosinmonofosfát	<b>P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub></b>	metabotropní purinergní receptory typu 1,2,4,6,11-14
<b>CK1 ε/δ</b>	kasein kináza 1; typ ε/δ	<b>PER</b>	protein hodinového genu <i>Per</i>
<b>CLOCK</b>	protein hodinového genu <i>Clock</i>		
<b><i>Clock</i></b>	hodinový gen (z angl. Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)		
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava		

<b><i>Per</i></b>	hodinový gen (z angl. Period)	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	faktor nádorové nekrózy alfa (angl. Tumor Necrosis Faktor Alpha)
<b>PKA</b>	proteinkináza A		
<b>PKC</b>	proteinkináza C	<b>TTFL</b>	negativní zpětnovazebná smyčka proteinů a jejich genů (angl. Transcriptional/posttranslational negative feedback)
<b>PLC</b>	fosfolipáza C		
<b>Rev-Erb</b>	rodina jaderných receptorů; typy $\alpha$ (Rev-ErbA $\alpha$ ) a $\beta$ (Rev-ErbA $\beta$ /Rev-Erb $\beta$ )	<b>TTX</b>	tetrodotoxin
		<b>UCPs</b>	uncoupling proteiny
<b>ROR</b>	rodina jaderných receptorů (z angl. RAR-related orphan receptor alpha); typy A ( $\alpha$ ) a B ( $\beta$ )	<b>VIP</b>	vasoaktivní střevní peptid (angl. Vasoactive Intestinal Peptide)
		<b>VL</b>	ventrolaterální
<b>SCN</b>	suprachiasmatické jádro		



## 2. Úvod

Cirkadiánní rytmy reflektující měnící se vnější prostředí jsou jedním z adaptačních mechanismů řídící fyziologii organismu. Pod jejich taktovkou se proměňuje široká škála fyziologických parametrů. Jedním z takových cirkadiánně proměnných jevů je plazmatická koncentrace melatoninu. Melatonin je hormon produkovaný buňkami epifyzy, který se do krve pravidelně uvolňuje během noci a ovlivňuje řadu fyziologických funkcí v organismu. Mimo jiné také zpětnovazebně působí i na oblast anteriorního hypotalamu označovanou jako suprachiasmatické jádro (SCN). To kontroluje produkci a sekreci melatoninu a je řídicím centrem biologických hodin organismu. Je natolik zásadní, že bez této nepříliš rozsáhlé párové struktury je organismus arytmičtý a neschopný se synchronizovat s vnějším světelným cyklem. Podstatou pacemakerové aktivity SCN je komplexní mechanismus zahrnující genový aparát každé jednotlivé buňky jádra, čítající jak neurony, tak astrocyty, a vzájemná součinnost těchto dílčích pacemakerů. Komunikace těchto všech SCN buňek je zajištěna širokou paletou signálních molekul. Jednou z takových by mohl být i adenosin-5'-trifosfát (ATP). ATP působí jako extracelulární signální molekula napříč živočišnou říší i v mnoha tkáních, včetně mozku, kde působí prostřednictvím specifických receptorů. Tato purinergní signalizace je významným komunikačním prostředkem mezi astrocyty navzájem i mezi astrocyty a neurony, kdy astrocyty prostřednictvím jimi uvolňovaného ATP modulují aktivitu přilehlých neuronů. Jako signální molekula figuruje extracelulární ATP i v SCN. Přítomné astrocyty uvolňují tento purin v pravidelném rytmu do extracelulárního prostoru tak, že nejvyšších hladin dosahuje ATP uprostřed temnostní fáze cirkadiánního rytmu. Do jaké míry se ovšem tento rytmus podílí na periodické činnosti SCN, a je-li kontrolován melatoninem, není známo.



molekulárního mechanismu biologických hodin (viz níže), nacházející se v AVP neuronech a regulující degradaci PER, mění délku periody buněčných hodin v jednotlivých buňkách, stejně jako lokomoční aktivitu zvířat (Mieda et al., 2016). Obdobně, specifická delece *Bmal1* v AVP neuronech má za následek nestabilní oscilace klíčových genů a prodlouženou periodu behaviorálního rytmu zvířat (Mieda et al., 2015). Nicméně buněčný mechanismus udávající cirkadiánní rytmus není úplně prozkoumán a pravděpodobně se neomezuje pouze na AVP neurony. Jako perspektivní kandidáti na pacemakery se jeví NMS neurony definované přítomností neuromedinu S. Prodloužením jejich periody cirkadiánního rytmu se prodlouží i perioda lokomoční aktivity zvířat a při zabránění jejich synaptické transmise dochází k arytmiicitě SCN sítě (Lee et al., 2015). AVP neurony v DM části jsou samy modulovány prostřednictvím VL části, která transformuje signály z retiny. Perioda AVP neuronů je tak nepřímě synchronizována s rytmem vnějšího světelného cyklu a je tak možná efektivní modulace periody a fáze cirkadiánního rytmu organismu (Moore, 1997). Při experimentálním přerušení spojení mezi VL a DM částí se rytmická aktivita dorzálních neuronů jakožto pacemakerů zachovává, nicméně bez vlivu VIP neuronů se jejich perioda prodlužuje do své endogenní podoby (Mieda et al., 2016). Komunikace mezi VL a DM částí je především jednosměrná, tak jak byla popsána výše, opačně, tedy z DM do VL části spolu neurony téměř nekomunikují.

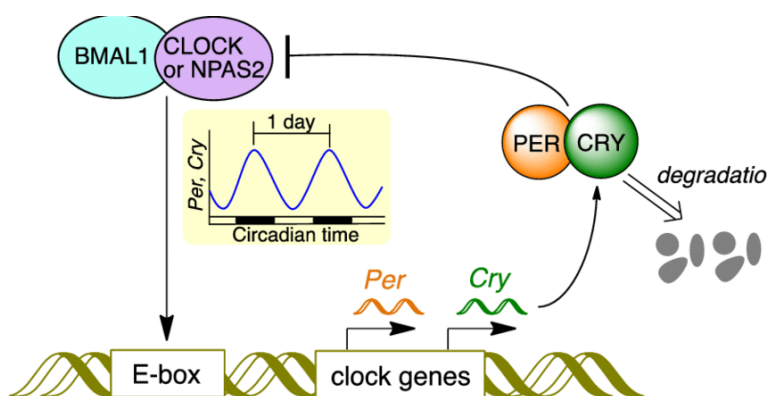
Neurochemie SCN je složitá a rozhodně není představována pouze výše zmíněnými peptidy. Jedná se ovšem o peptidy nejčastěji zastoupené – 37 % je AVP pozitivní, 24 % VIP pozitivních, neurony exprimující GRP a kalretinin představují populace zhruba o 14 %, další populace neuronů charakterizované přítomností neurotrypsinu, enkefalinu, SS peptidu nebo substance P zahrnují méně jak 5% části SCN. Mimo to, mnoho neuronů je pozitivních na více než jen jeden peptid jako například právě NMS (Lee et al., 2015), což dohromady spolu s dalšími nejmenovanými markery zajišťuje obrovskou heterogenitu SCN. (Silver, 2018).

Informace kódující cirkadiánní rytmitu formovaná v SCN je dále předávána eferentními projekčními drahami směřujícími především do hypotalamu, talamu a prodloužené míchy. Cílové struktury následně řídí např. cyklus bdění a spánku a cirkadiánní rytmus příjmu potravy, které jsou řízené prostřednictvím laterálního hypotalamu, nebo např. rytmus syntézy melatoninu regulovaný nepřímě paraventriculárním jádrem hypotalamu (Hastings et al., 2019).

### 3.1.2. Rytmicita

Rytmicita je měřitelná na všech úrovních od subbuněčné až po celoorganismální. V buňkách SCN se cirkadiánním vzorcem proměňuje intracelulární koncentrace vápníkových kationtů ( $[Ca^{2+}]_i$ ) a cyklického AMP ( $[cAMP]_i$ ) nebo membránový potenciál (Colwell, 2011; O'Neill and Reddy, 2012). Podstatou těchto změn je mechanismus zakódovaný v transkripčno-translační zpětnovazebné smyčce (TTFL), kdy transkripce hodinových genů je zpětnovazebně regulována samotnými proteiny. Hlavní smyčka je tvořena geny *Bmal1* a *Clock*, jejichž translační produkty tvoří heterodimer BMAL1/CLOCK, který se váže na E-box v promotoru genů *Period* (*Per1*, *Per2*) a *Cryptochrom* (*Cry1*, *Cry2*) a spouští jejich transkripci. Geny *Per1*, *Per2* jsou regulovány prostřednictvím promotorového elementu CRE a jejich transkripce je tak úzce svázána se změnami  $[Ca^{2+}]_i$ ,  $[cAMP]_i$ , jak byly zmíněny výše (O'Neill and Reddy, 2012). Tyto geny také představují cílovou strukturu v synchronizaci hodin se světelným cyklem, protože právě na CRE elementu se konvergují signální dráhy vedoucí od aktivovaných glutamátových receptorů díky uvolňovanému glutamátu z fotosenzitivních gangliových buněk (Gau et al., 2002). Proteinový

komplex PER/CRY zpětnovazebně inhibuje transkripci svých vlastních genů tím, že proniká do jádra a blokuje působení BMAL1/CLOCK. Nový cyklus začíná poté, co je degradován represorový komplex PER/CRY, transkripce *Per* a *Cry* začíná nanovo a zahajuje se tak další přibližně 24hodinový cyklus (Obr.2).



Obr.2. Hlavní transkripčno-translační zpětnovazebná smyčka cirkadiánního systému savčích buněk. Dimer BMAL1/CLOCK se váže na E-box a spouští transkripci *Per* a *Cry*. Dimer PER/CRY následně svou vazbou na dimer BMAL1/CLOCK blokuje vlastní transkripci. Degradaci PER/CRY začíná nový cyklus. Upraveno dle Minegishi et al., 2018

K větší robustnosti systému jsou pod regulací heterodimeru BMAL1/CLOCK i další přidatné smyčky molekulárních hodin zahrnující Rev-ErbA, Rev-ErbB a RORA geny. Součástí mechanismu jsou i enzymy modulující stabilitu PER a CRY jako E3 ubiquitin ligázy Fbxl3 a Fbxl21 regulující degradaci CRY proteinů nebo CK1 $\epsilon/\delta$ , která prostřednictvím fosforylace reguluje degradaci PER proteinů. TTFL je v pacemakerových buňkách SCN zachovávána autonomně a prostřednictvím tzv. clock-controlled genů předává informaci o cirkadiánním čase po informační linii od molekulárního oscilátoru dále do buňky a nakonec i z ní. To je podstatou

cirkadiánních cyklů buněčné aktivity, od které se následně odvíjí cirkadiánní chování a fyziologie (Hastings et al., 2014).

Výše popsaný mechanismus TTFL probíhá nejen v každém neuronu SCN, ale pravděpodobně i ve všech buňkách těla. Nicméně je zapotřebí právě informací z SCN, aby byly periferní buňky svými vnitřními hodinami synchronizovány. Při experimentálním odstranění SCN jsou periferní buňky nekoordinovány a zvířata arytmiická (Kafka et al., 1985). Naopak při transplantaci SCN štěpu SCN-deficientním zvířatům se u nich cirkadiánní rytmicita obnovuje s periodou donora tkáně (Ralph et al., 1990). Natolik kritické cirkadiánní časování SCN je umožněno díky komplexním propojením přítomných buněk. V disperzních kulturách si sice neurony zachovávají svůj vnitřní rytmus, ovšem samotná rytmická aktivita jednotlivých neuronů nestačí (Welsh et al., 2010). Exprese cirkadiánních genů postupuje SCN jako vlna způsobem, že neurony DM části dosahují vrcholu fáze průměrně 2-3 hodiny před neurony VL části, tedy TTFL jednotlivých oscilátorů nejsou všechny ve stejné fázi, nicméně udržují specifický fázový vztah (Hastings et al., 2014). Tak aby byla síť SCN koherentní, je zapotřebí právě vzájemné intercelulární komunikace mezi jednotlivými oscilátory.

Ačkoli o procesu, jakým jsou buňky vzájemně synchronizovány, není známo příliš mnoho, svou roli hrají peptidy VIP, AVP a GRP (S Maywood et al., 2011). GABA, která je exprimována ve všech SCN neuronech, je do mechanismu nejspíš také zapojena (Barca-Mayo et al., 2017), nicméně její efekt na síť je diskutabilní a pravděpodobně závislý na fázi cirkadiánního rytmu a na konkrétní oblasti SCN (Ono et al., 2018). Každopádně je ovšem GABAergní signalizace zásadní pro součinnost (angl. coupling) dorzálního a ventrálního SCN (Albus et al., 2005). Za eminentní v procesu synchronizace je považována role VIP signalizace. Myši, které postrádají receptor VPAC2 pro VIP jsou arytmiické a dochází u nich k poruše cirkadiánní exprese hodinových genů i na úrovni jednotlivých buněk (Harmar et al., 2002). Vazba VIP na receptor vede k aktivaci  $G_q$  proteinu, změně  $[Ca^{2+}]_i$  a k aktivaci CRE, která je spojena s transkripcí genů *Per1* a *Per2*. Jedná se tedy o dráhu, která je zásadní v regulaci cirkadiánních vlastností SCN prostřednictvím reprogramování dynamiky vápníkových rytmů v buňce a následně i TTFL. V případě absence VIP signalizace dochází k narušení vápníkových rytmů v jednotlivých buňkách i k desynchronizaci sítě (Brancaccio et al., 2013). Stejný neuropeptid je v závislosti na času a dávce schopen synchronizovat rytmy *Per2* u astrocytů (Marpegan et al., 2009). Vedle VIP byly výše zmíněné i další dva peptidy AVP, GRP. Jejich efekt na synchronizaci není natolik významný jako ten VIP a SCN je schopno jejich deficit do jisté míry kompenzovat (Aida et al., 2002; Li et al., 2009), nicméně porušení jejich signalizace se projevuje právě v kombinaci s chybějící signalizací VIP (S Maywood et al., 2011). Svou roli

v rytmicitě SCN hraje i glutamát spojený s aktivitou astrocytů (Brancaccio et al., 2017). Detailněji je ovšem proces probrán v následujícím oddílu.

Celkově vzato, ačkoli se v tomto textu mluví o autonomii TTFL, je tento molekulární mechanismus úzce zpětnovazebně propojen s procesy, které se od něho odvozují (Brancaccio et al., 2013). Takové je např. propojení membránového potenciálu a TTFL, kdy při aplikaci tetrodotoxinu (TTX), blokátoru napěťově řízených  $\text{Na}^+$  kanálů, dochází i k narušení projevů TTFL (Yamaguchi et al., 2003). Oscilace cirkadiánních rytmů jsou mimo vnějších světelných signálů schopny podléhat i signálům z periferie, mezi které patří melatonin, ale i mnoho dalších např. glukokortikoidy, teplota nebo i lokomoční aktivita. Je otázkou na jaké úrovni cirkadiánního oscilátoru tento systémový feedback působí, pravděpodobně to totiž není přímo samotný mechanismus molekulárních hodin jako spíše struktury a procesy „downstream“ od něj jako je např. membránový potenciál (Abitbol et al., 2017; van Oosterhout et al., 2012).

### 3.2. Astrocyty

Astrocyty představují multifunkční buňky naprosto nezbytné pro správnou činnost nervového systému. Homeostaticky působí v regulaci koncentrací iontů, neurotransmiterů a jiných signálních molekul a spolu s mikrogliemi zaujímají úlohu v imunitním systému CNS. Astrocytární buňky také představují klíčový element v metabolismu dvou předních neurotransmiterů, glutamátu a GABA (Schousboe et al., 2013). Dále participují na stavbě nervového systému, utváří hematoencefalickou bariéru a regulují synaptogenezi. (Allen, 2013; Harada et al., 2015).

S neurony astrocyty aktivně komunikují v modelu tzv. tripartitní synapse, kde jsou astrocyty asociovány s presynaptickou a postsynaptickou membránou neuronu. Astrocyty jsou aktivovány v odpovědi na uvolňované neurotransmitery a recipročně signalizují neuronům prostřednictvím vlastních gliotransmiterů především glutamátu, D-serinu, ATP a dalších (Araque et al., 1999).

#### 3.2.1. Astrocyty v SCN

Neurony jsou sice nejpočetnějším buněčným typem SCN, nicméně ne jediným. Značnou část SCN představuje populace astrocytárních buněk, které s neurony pojí prokazatelná cirkadiánní rytmicita (Prolo et al., 2005). Jejich marker, protein GFAP (angl. Glial fibrillary acidic protein), se na buněčných membránách i v konstantní tmě vyskytuje v souladu s cirkadiánním rytmem (Lavialle and Servière, 1993). Astrocyty SCN stejně jako neurony exprimují TTFL (Tso et al., 2017), vykazují cirkadiánní rytmy v  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a tedy jejich aktivita se

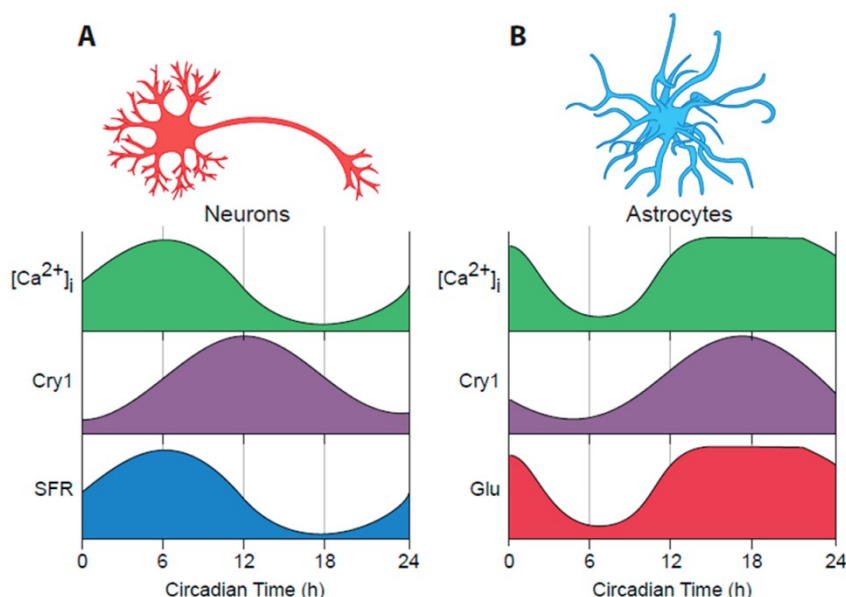
mění s cirkadiánním vzorcem, nicméně na rozdíl od neuronů dosahují tyto procesy maximálních hodnot během subjektivní noci a jsou tak s neuronálními procesy v antifázi (Obr.3) (Brancaccio et al., 2017; Hastings et al., 2019).

Mimoto uvedenou cirkadiánní fyziologii astrocytů se tyto glie podílí i jako činitelé přímo na formování cirkadiánní rytmicity v SCN, tj. pacemakingu. Jejich přímé zapojení do tohoto procesu bylo prokázáno u *Drosophily melanogaster* (Suh and Jackson, 2007) a stále narůstá počet studií, že jinak tomu není ani u savců.

Delece *Bmal1* v astrocytech SCN prodlužuje jednak cirkadiánní periodu aktivity neuronů, ale dochází i k prodloužení periody lokomoční aktivity takto upravených zvířat (Brancaccio et al., 2017). Obdobně, delece astrocytární specifickou rekombinázou CK1ε tau mutace, která zvířata charakterizuje kratší endogenní periodou rytmu, došlo k prodloužení periody na úrovni molekulárního mechanismu i na úrovni lokomoční aktivity (Brancaccio et al., 2017). V obou

případech byly neurony a následně činnost SCN ovlivněné pouze změnami na úrovni astrocytárních buněk, které svou periodou nastavily řízení celého systému.

Při studiu Cry-null myší<sup>1</sup> se pomocí virových vektorů modifikovalo SCN, tak aby došlo k obnově exprese *Cry1* buď u astrocytů, nebo u neuronů (Brancaccio et al., 2019). Závěrem bylo, že nejen obnovení exprese *Cry1* u neuronů, ale i pouze jen u astrocytů bylo dostatečné k nastolení



Obr.3. Schématický pohled na cirkadiánní rytmicitu u SCN neuronů a astrocytů. (A) SCN neurony vykazují cirkadiánní rytmy v  $[Ca^{2+}]_i$ , které mohou být dány do fáze s TTFL (v tomto případě transkripcí *Cry1*) a cirkadiánním rytmem elektrické aktivity neuronů (SFR; spontaneous firing rate). SFR a  $[Ca^{2+}]_i$  dosahují vrcholu současně uprostřed cirkadiánního dne, v předstihu před vrcholnou transkripcí *Cry1*. (B) SCN astrocyty také vykazují cirkadiánní rytmy v  $[Ca^{2+}]_i$  a TTFL, které se ovšem od neuronů odlišují fází (u astrocytů jsou zpožděné) a také vlnovou formou (u astrocytů je vrchol širší). Cirkadiánní rytmus extracelulárního glutamátu probíhá paralelně s rytmy  $[Ca^{2+}]_i$  u astrocytů. Tento kvazi-antifázický vztah mezi cirkadiánní rytmicitou astrocytů a neuronů odráží vzájemnou souhru těchto buněčných populací, která koordinuje buněčnou aktivitu a pacemaking v SCN. Upraveno dle Hastings et al., 2019

<sup>1</sup> Myši deficientní v genech *Cry1* a *Cry2*

cirkadiánních oscilací *Per2* v SCN, a tedy k zahájení pacemakerové činnosti jinak arytmiického SCN. Obnovení exprese *Cry1* v astrocytech indukovalo prostřednictvím parakrinní signalizace TTFL u SCN neuronů a došlo i k obnovení cirkadiánní rytmicity v lokomoční aktivitě zvířat. Významnou roli v této astrocyt-neuronové komunikaci představuje glutamát, který je astrocyty v rytmech uvolňován do extracelulárního prostoru v souladu se zvýšenou  $[Ca^{2+}]_i$  (Brancaccio et al., 2017) prostřednictvím hemikanálů tvořených podjednotkou konnexinu 43 (Brancaccio et al., 2019). Tato specifická interakce mezi astrocyty a neurony je kritická pro zachování rytmu  $[Ca^{2+}]_i$  neuronů, je vázána na dorzální SCN a zprostředkována NMDA (N-methyl-D-asparagová kyselina) receptory s podjednotkou NR2C, která je specifická právě pro tuto oblast SCN. Na rozdíl od tradičního modelu působí tento astrocytární glutamát na neuronovou síť inhibičně, a to pravděpodobně prostřednictvím potenciace presynaptických GABAergních neuronů (Brancaccio et al., 2017). Vedle uvolňování glutamátu, regulují astrocyty jeho hladinu v extracelulárním prostoru i opačně jeho vychytáváním prostřednictvím glutamátového transportéru EAAT1. K transkripci mRNA pro EAAT1 dochází v závislosti na fázi cirkadiánního rytmu a množství transportéru na membránách astrocytů je závislé na expresi *Per2*. Při narušení exprese *Per2* dochází ke snížení množství EAAT1 na membránách astrocytů a koncentrace glutamátu v extracelulárním prostoru narůstá (Spanagel et al., 2005). Přestože je EAAT1 závislé na hodinovém genu *Per2*, nemění se jeho množství na membránách cirkadiánně. Glutamátový uptake je ovšem silně závislý na signalizaci z retiny. Za podmínek střídání světla a tmy (LD cyklu) je uptake glutamátu signifikantně vyšší během světelné fáze oproti temnostní, v případě konstantní tmy (DD cyklu) se ovšem tyto rozdíly stírají. Endogenně je naopak řízená aktivita jiné molekuly spojená s glutamátovým metabolismem a tou je enzym glutaminsyntáza, která v astrocytech přeměňuje pohlcený glutamát na glutamin. Glutaminsyntáza je vysoce aktivní během dne a opačně je tomu během noci (Leone et al., 2015).

Vedle glutamátu je další signální molekulou v astrocyt-neuronové komunikaci, která se podílí na správné organizaci oscilátoru, GABA. Astrocyty regulují extracelulární koncentraci tohoto neurotransmiteru prostřednictvím transportérů GAT1 a GAT3 a předcházejí tak jeho nežádoucí akumulaci (Moldavan et al., 2015). Při delecii *Bmal1* u astrocytů dochází ke snížení množství GABA transportérů a tedy k nárůstu koncentrace GABA. Následkem je narušení cirkadiánních oscilací SCN neuronů, jejich desynchronizace a arytmicita v lokomoční aktivitě zvířat (Barca-Mayo et al., 2017).

Astrocyty SCN jsou také schopny posunout svou fázi rytmu exprese *Per2* pod vlivem TNF $\alpha$  a v reakci na to i modulovat expresi hodinových genů v sousedních buňkách. Obdobně je TNF $\alpha$  schopno při aplikaci *in vivo* posunout fázi rytmu lokomoční aktivity (Duhart et al.,



2013). Vzhledem k tomu, že  $\text{TNF}\alpha$  figuruje jako významná molekula v imunitní odpovědi, mohly by astrocyty představovat prostředníky mezi imunitním a cirkadiánním systémem (Duhart et al., 2013).

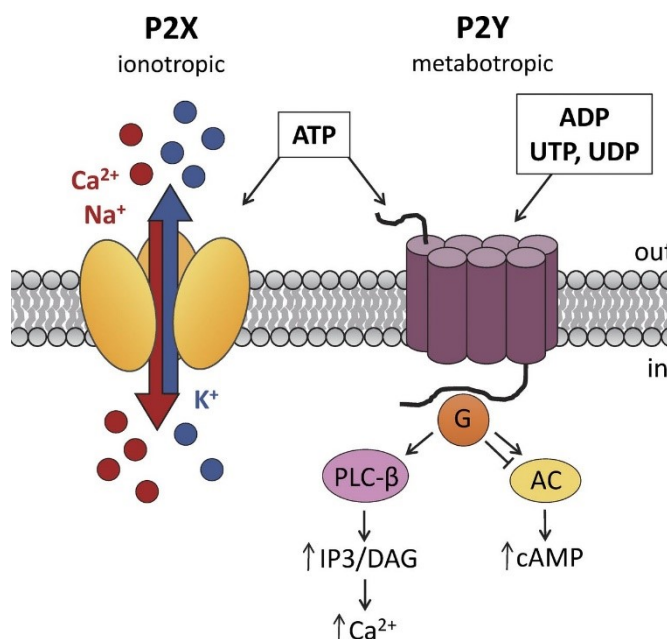
Součtem výše zmíněných příkladů lze říci, že SCN představuje strukturu o dvou do jisté míry autonomních buněčných populací, astrocytární a neuronální, které vzájemně kooperují při formování cirkadiánních rytmů.

### 3.3. ATP jako signální molekula

Přestože je ATP známé především jako nejvýznamnější molekula pohánějící intracelulární procesy, zaujímá i důležitou roli v mezibuněčné signalizaci. Takové působení ATP spolu s jeho katabolickými produkty, ADP a adenosinem, které vznikají činností ektonukleotidáz, se sdružuje pod pojmem purinergní signalizace (Burnstock, 2014).

V periferním nervovém systému funguje ATP jako excitační neurotransmiter, v CNS jako kotransmiter a modulátor synaptického přenosu, ale i jako trofická molekula regulující buněčnou proliferaci, růst, vývoj a také cytotoxicitu (Abbracchio et al., 2009). To vše prostřednictvím purinergních receptorů. Ty zahrnují dvě hlavní skupiny, a to sice P1 receptory pro adenosin a P2 receptory s hlavním ligandem představovaným ATP.

P1 receptory se dělí na čtyři subtypy  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  a  $A_3$  všechny jsou spojené s regulací adenylátcyklázy,  $A_1$  a  $A_3$  negativně zatímco  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  pozitivně. U P2 receptorů se rozlišují dvě podskupiny P2X a P2Y. P2X skupina zahrnuje celkem 7 ionotropních receptorů  $P2X_1$  –  $P2X_7$ . Unikátním znakem  $P2X_7$  receptoru je schopnost podstoupit konverzi za vzniku póru, který je prostupný i pro velké molekuly včetně ATP, a také mnohonásobně vyšší koncentrace ATP nutná k aktivaci ve srovnání s dalšími typy P2X receptorů. Skupina P2Y zahrnuje



Obr.4. **Purinergní receptor.** P2X receptory jsou trimerické iontové kanály, kde každá podjednotka se skládá ze dvou transmembránových domén. Vazba ATP způsobí konformační změnu, která otevře pór a umožní průstup  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^{+}$  do buňky a  $\text{K}^{+}$  z buňky. P2Y receptory jsou spřaženy s G-proteiny. Vazba ATP (ADP, UTP nebo UDP) aktivuje v závislosti na G proteinu ( $P2Y_{1,2,4,6,11}$  s  $G_{q/11}$ ,  $P2Y_{11}$  s  $G_s$  a  $P2Y_{12,13,14}$  s  $G_{i/o}$ ) asociovaném s receptorem různé signální kaskády. Upraveno dle Björkgren and Lishko, 2016

8 metabotropních receptorů, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, které jsou spojeny s G<sub>q/11</sub> proteiny a P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> spjaté s G<sub>i/o</sub> proteiny (Obr.4) (Burnstock, 2018).

Jak bylo řečeno výše, ATP je excitačním neurotransmiterem a podílí se také na komunikaci mezi astrocyty a neurony. V neokortexu se ATP uvolňované z astrocytů podílí jak na rychlých excitačních jevech aktivací P2X receptorů, tak na modulaci inhibice neuronové sítě prostřednictvím tlumivého vlivu na GABA<sub>A</sub> receptory (Lalo et al., 2014). V bazálním telencefalu je ATP excitačním neurotransmiterem podílející se v kontrole spánku a bdění ve směru podpory stavu bdělosti (Yang et al., 2018). Z ATP vzniklý adenosin působí opačně – snižuje bdělost a navozuje a prodlužuje spánek (Porkka-Heiskanen et al., 1997). Jako signální molekula se ATP vyskytuje ve smyslových orgánech, sluchových a chuťových buňkách (Bell et al., 2003; Huang et al., 2007) a v retině (Newman, 2001). V hipokampu představuje jeden z neurotransmiterů podílející se na dlouhodobé potenciaci, která je klíčová v mechanismu učení (Pascual et al., 2005).

ATP je také jedním z hlavních gliotransmiterů, tedy signálních molekul uvolňovaných právě gliemi, které ovlivňují činnost neuronů. Mimo to je ATP významnou molekulou autokrinní komunikace v rámci populace astrocytů. Odpovědí na extracelulární ATP je u astrocytů zvýšení [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> a uvolnění dalšího ATP, které obdobným způsobem prostřednictvím P2Y receptorů signalizuje přilehlým astrocytům (Guthrie et al., 1999). Výsledkem tohoto jevu je vznik tzv. vápníkové vlny a synchronizace astrocytární populace (Leybaert and Sanderson, 2012), která následně jako celek reguluje neuronovou síť. V hipokampu je např. astrocytární vápníková vlna zajištěna autokrinním působením ATP skrze P2Y<sub>1</sub> receptory, výsledkem je následné uvolnění astrocytárního glutamátu, které excitačně působí na přilehlou neuronální síť (Shen et al., 2017).

Ve vývoji působí ATP jako mitogenní faktor, zvyšuje proliferaci kmenových buněk a potlačuje diferenciaci (Lin et al., 2007; Ryu et al., 2003). V CNS je zvýšená extracelulární koncentrace ATP ([ATP]<sub>e</sub>) doprovázející poškození spouštěcím mechanismem aktivujícím astrocyty a mikroglie a zahajující tak imunitní odpověď (Davalos et al., 2005). Purinergní signalizace se také podílí na patologických procesech. Již zmíněná patologicky zvýšená ([ATP]<sub>e</sub>) vede k aktivaci nízkoafinitních P2X<sub>7</sub> receptorů, což má za následek změny v excitabilitě postižených neuronů (Del Puerto et al., 2015). Tentýž receptor je spojen s patofyziologií řady neurodegenerativních chorob a psychiatrických onemocnění jako např. deprese (Sperlágh and Illes, 2014).

### 3.4. Rytmická akumulace extracelulárního ATP v SCN

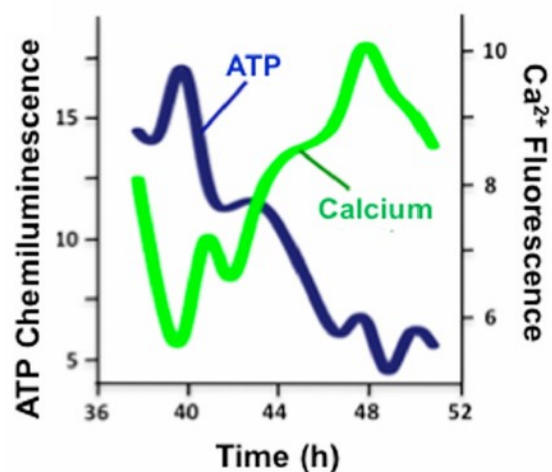
SCN představuje perpetuum mobile biologických hodin organismu, které si nezávisle na okolních signálech zachovává charakteristickou rytmickou aktivitu s periodou přibližně 24 hodin. Ta je experimentálně měřitelná na mnoha úrovních od molekulární TTFL, tak jak byla popsána výše, po elektrofyziologická měření, kdy vysokou neuronální aktivitu během dne střídá nízká během noci. Stejně tak lze zaznamenat i cirkadiánní proměnlivost v koncentracích některých signálních molekul. Rytmicky se v SCN uvolňuje například AVP, který dosahuje nejvyšších hladin uprostřed subjektivního dne, a naopak nejnižších dosahuje během noci. Svým průběhem se tak překrývá s elektrickou aktivitou neuronů SCN (Svobodova et al., 2003). Podobně proměnlivá je i  $[ATP]_e$  (Womac et al., 2009).

Na rozdíl ovšem od výše zmíněného rytmu AVP, je rytmus ATP přesně opačný a dosahuje tedy nejvyšších hodnot v druhé polovině subjektivní noci, nejnižších pak během světelné fáze cyklu (Svobodova et al., 2018; Womac et al., 2009). Je tak negativně korelován s elektrickou a metabolickou aktivitou SCN (Yamazaki et al., 1994). Vzhledem k tomuto faktu spolu s doposud objasněnými díly celého procesu uvolňování purinu, tak jak budou popsány níže, je dogma takové, že ATP se v extracelulárním prostoru SCN nevyskytuje jako němý metabolický produkt, ale jako signální molekula (Svobodova et al., 2018). Jeho celková koncentrace je v SCN více jak čtyřikrát vyšší v porovnání s jinými oblastmi mozku (Yamazaki et al., 1994), navíc teorii nahrává i široké zastoupení purinergních receptorů v SCN. Jsou zde především homogenně zastoupeny všechny známé receptory jak typu P2X, tak P2Y (Bhattacharya et al., 2013), z nichž konkrétně podtypy P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>14</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>1</sub> se svým množstvím na membránách liší v závislosti na cirkadiánním rytmu (Lommen et al., 2017).

Rytmus ATP je endogenní, je přítomen jak *in vivo*, stejně tak je ovšem zachovávan in *in vitro* kulturách (Womac et al., 2009). ATP je do extracelulárního prostoru uvolňováno s nejvyšší pravděpodobností astrocyty (Bhattacharya et al., 2013; Womac et al., 2009), ovšem mechanismus, jakým proces probíhá, není plně objasněn. Je známo, že je pod kontrolou hodinových genů *Clock*, *Per1* a *Per2* (Marpegan et al., 2011), a klíčovým elementem procesu jsou vápníkové kationty. Vápníkový pufr BAPTA redukuje množství extracelulárního ATP a stejně tak i  $Ca^{2+}$  rytmy v mitochondriích, které na rozdíl od sarkoplazmatického retikula představují klíčové buněčné organely spjaté s ATP rytmem. Hladina  $Ca^{2+}$  se v mitochondriích astrocytů rytmicky proměňuje paralelně s měnící se  $[ATP]_e$  a inhibice mitochondriálního  $Ca^{2+}$  uniporteru Ru360 značně snižuje množství uvolňovaného ATP (Burkeen et al., 2011). Důvodem paralelně se zvyšující  $[ATP]_e$  a koncentrace mitochondriálního  $Ca^{2+}$  může být přímá

závislost oxidativního metabolismu na hladině  $\text{Ca}^{2+}$  v mitochondriích. Na zvýšení mitochondriální koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  je závislá mitochondriální respirace, včetně produkce ATP (Wiederkehr et al., 2011), tato přímá korelace byla prokázána např. u hipokampálních astrocytů, u kterých bylo uvolňování ATP inhibováno aplikací fluoroacetátu (Heinrich et al., 2012). Cirkadiánně je ovšem regulována i celá řada dalších metabolických procesů, které by tak mohly limitovat dostupnost ATP jako své hlavní výstupní molekuly. Mechanismem cirkadiánních hodin jsou řízeny např. glykolýza, glukoneogeneze a oxidace mastných kyselin a v savčím SCN například dochází k cirkadiánním oscilacím v expresi hexokinázy 1, enzymu, který reguluje dostupnost glukózy využitelné pro buňky či v proteinech respiračního řetězce (Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2013; Mazzocchi et al., 2012).

Hladina  $\text{Ca}^{2+}$  se vedle mitochondrií cirkadiánně mění i v rámci cytosolu, ovšem s průběhem, který je přesně opačný tomu, který je pozorovaný právě v mitochondriích (Obr.5) (Burkeen et al., 2011). Nezbytná pro správný průběh procesu je i funkční  $\text{IP}_3$  nitrobuněčná signalizace, která zajišťuje uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  do cytoplasmy z vnitrobuněčných zásob endoplazmatického retikula (Marpegan et al., 2011). Na plazmatické membráně SCN astrocytů se do celého procesu zapojuje sada různých molekul zahrnující vedle purinergních receptorů  $\text{P2X}_7$ ,  $\text{P2Y}_1$  a  $\text{P2Y}_2$  i pannexin-1-hemikanály a také napětově závislé vápníkové kanály (Svobodova et al., 2018). V této sestavě se na krucialním zvyšování  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podílejí mimo zřejmých napětových vápníkových kanálů i právě zmíněné  $\text{P2X}_7$  a  $\text{P2Y}$  receptory (Svobodova et al., 2018).



Obr.5. Graf znázorňující vztah mezi  $[\text{ATP}]_e$  a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Osa nalevo představuje hladinu extracelulárního ATP získanou na základě chemiluminiscenční analýzy, osa napravo koncentraci intracelulárního vápníku změřenou díky fluorescenčnímu barvivu. Na grafu je vidět inverzní charakter těchto dvou rytmů. Upraveno dle Burkeen et al., 2011

Způsob, jakým se ATP dostává přes membránu, znám není. Exocytóza, která je jinak buňkami často využívaným mechanismem uvolňování molekul do extracelulárního prostoru (Coco et al., 2003; Lalo et al., 2014), se v tomto procesu nejeví příliš pravděpodobně (Marpegan et al., 2011). Nicméně ATP se z buněk uvolňuje i nevezikulárními způsoby. Nabízí se tak role pannexin-1-hemikanálů, které patří mezi poznané cesty uvolňování ATP (Huang et al., 2007; Li et al., 2011), byly asociovány se šířením astrocytární vápníkové vlny zprostředkované ATP

(Iglesias et al., 2009) a zároveň se vyskytují na astrocytech SCN (Svobodova et al., 2018). Dále mezi popsané mechanismy uvolňování ATP patří hemikanály vodivých spojů (Kang et al., 2008; Stout et al., 2002), P2X<sub>7</sub> receptory (Sperlágh and Illes, 2014), které jsou také druhou nejvíce exprimovanou jednotkou P2X receptorů v SCN a jsou zastoupeny na astrocytech (Bhattacharya et al., 2013), membránové kanály jako např. *volume sensitive anion channels* (Okada et al., 2004) a CFTR protein (Kanno and Nishizaki, 2011). Buňky jsou také schopny uvolňovat ATP prostřednictvím exocytózy svých lysozymů. To je proces závislý na Ca<sup>2+</sup>, probíhá pomaleji ve srovnání s klasickou vezikulární exocytózou, ovšem jako relevantním způsobem uvolňování ATP do extracelulárního prostoru se jeví především v patologických podmínkách (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2007).

ATP rytmus není objasněný fenomén. Jeho význam se diskutuje především v teoretických rovinách a není tedy ani v moci této práce přinést na tuto otázku jasnou a stručnou odpověď. Za etablovanou tezi lze ovšem považovat, jak bylo již zmíněno výše, že ATP hraje v SCN roli signální molekuly. Není ovšem jasné, zda se podílí na regulaci cirkadiánních rytmů. Adenosintrifosfát není nezbytný pro zachování cirkadiánní rytmicity astrocytů (Marpegan et al., 2011), mohl by ale působit jako jeho parakrinní modulátor (Svobodova et al., 2018), vzhledem k tomu, že puriny jsou schopny zasahovat do mechanismu molekulárních hodin a recipročně jsou jimi i ovlivňovány (Lindberg et al., 2018). Například u myších mikroglií indukuje ATP prostřednictvím aktivace P2X<sub>7</sub> receptorů expresi *Per1* (Nakazato et al., 2011).

ATP je svým gliotransmitterským působením známé napříč mozkovými regiony a ani SCN není výjimkou. Extracelulární purin aktivuje P2X<sub>2</sub> receptory, které jsou výhradně kolokalizované s presynaptickými nervovými zakončeními, což vede ke zvyšování GABAergní transmise a tedy tlumení postsynaptických neuronů (Bhattacharya et al., 2013). Vezme-li se v potaz, že hladina [ATP]<sub>e</sub> je nejvyšší během noci, mohl by rytmus ATP představovat mechanismus nočního útlumu neuronů. Mohlo by se ovšem jednat i o způsob synchronizace biologických rytmů se světelným cyklem vzhledem k tomu, že na působení ATP je citlivější VL oblast SCN, tedy ta, která je zvnějšku inervovaná neurony retiny, a právě i ta oblast, ve které během temností fáze vzroste množství P2X<sub>4</sub> receptorů schopných na extracelulární purin reagovat (Bhattacharya et al., 2013; Lommen et al., 2017). Právě P2X<sub>4</sub> ještě spolu s P2X<sub>3</sub> patří mezi purinergní receptory obývající buněčné membrány s cirkadiánním vzorcem a jsou to právě tyto receptory, jejichž nárůst probíhá paralelně s nárůstem [ATP]<sub>e</sub> (Lommen et al., 2017). Na výše uvedených studiích proto stojí hypotéza, že se purinergní signalizace podílí na modulaci neurotransmise v retinohypotalamickém traktu. ATP je ovšem také spojováno s buněčnými

růstovými procesy, včetně přímého vlivu na astrocyty a prodlužování jejich výběžků (Neary et al., 1996). Z tohoto hlediska je příhodné zmínit cirkadiánní změny v ultrastruktuře SCN, které jsou vnímány jako důležitý mechanismus v seřizování biologických hodin se světelným cyklem. Astrocytární výběžky posilují během noci kontakty s dendrity VIP neuronů a snižují ty, které mají s AVP neurony. Opačným způsobem se paralelně proměňují interakce mezi gliemi a těly jak VIP, tak i AVP neuronů (Becquet et al., 2008).

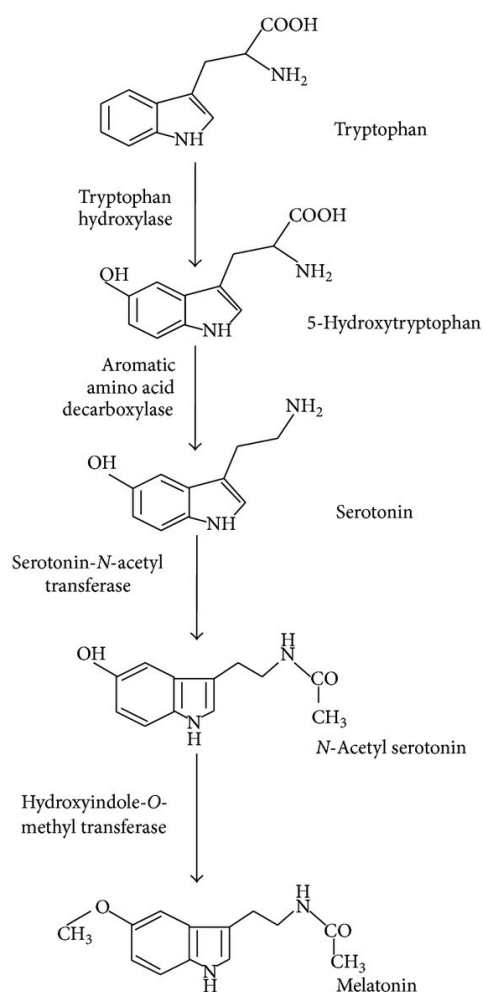
O ATP se dá také uvažovat jako o zdroji adenosinu, který z purinu vzniká pod vlivem ektonukleotidáz. Podobně jako ATP i adenosin je schopen modulovat expresi hodinových genů (Ruby et al., 2014). Adenosin sám o sobě je významnou signální molekulou podílející se nemalou měrou na modulaci spánku, kdy se jako metabolit neuronálního metabolismu hromadí během bdělosti v extracelulárním prostoru a podněcuje tak spánek (Porkka-Heiskanen et al., 1997). V *pars basalis telencephali* působí adenosin protichůdně k ATP. Adenosin zde zvyšuje GABAerní transmissi a iniciuje tak spánek (Basheer et al., 2004). Oproti tomu astrocyty uvolňované ATP během temnostní fáze, ale ne během světelné, zvyšuje prostřednictvím aktivace P2 receptorů uvolňování glutamátu a současně tak posiluje bdělost a potlačuje spánek (Yang et al., 2018). Vzhledem k odlišeným reakcím systému během fází cirkadiánního rytmu se uvažuje, že v *pars basalis telencephali* dochází buď k cirkadiánní regulaci  $[ATP]_e$ , obdobnému tomu v SCN, nebo cirkadiánní regulaci P2 receptorů (Yang et al., 2018). Zůstaneme-li v rámci hypotéz v SCN, do současné doby není známo nic o případné cirkadiánně se měnící koncentraci extracelulárního adenosinu, ani o možných proměnných zastoupeních adenosinových receptorů v SCN, nicméně v jiných oblastech mozku se koncentrace adenosinu periodicky proměňuje (Chagoya de Sánchez, 1995), což souvisí s výše uvedeným zapojením do procesu modulace spánku. Přesto se ovšem adenosin sám o sobě podílí na fyziologii SCN jako molekula regulující retinohypotalamickou neurotransmisi. Jak u křečků, tak u myší bylo prokázáno, že adenosin aktivuje presynaptické  $A_1$  receptory umístěné na terminálách neuronů pronikajících z retiny a snižuje tak uvolňování excitačního glutamátu přenášející světelnou informaci do SCN (Hallworth et al., 2002). Adenosin tedy moduluje informační vstupy proudící do SCN a nabízí se tak teorie pracující jednak s adenosinem jako metabolitem na jedné straně anebo adenosinem jako primárním regulátorem na straně druhé. Zaprvé, během spánkové deprivace, při které by koncentrace adenosinu jako metabolitu stoupala, reguloval by tento nukleosid odpověď cirkadiánních hodin na světlo (Sigworth and Rea, 2003), obdobně jako adenosin posiluje spánek v případě jeho nedostatku působením v jiných oblastech mozku (Porkka-Heiskanen et al., 1997). Vedle toho ovšem, pokud by se koncentrace adenosinu cirkadiánně proměňovala, mohl by hrát adenosin významnou roli jakožto součást

fyziologického mechanismu regulujícího cirkadiánní rytmy, především tedy ve vztahu k odpovědi SCN neuronů na světelnou signalizaci.

### 3.5. Melatonin

#### 3.5.1. Charakteristika

Melatonin je lipofilní hormon, známý díky typickému rysu své syntézy probíhající po západu slunce s vrcholem mezi 1 - 5 hodinou ranní jako „hormon noci“ či „spánkový hormon“ (Zhdanova et al., 1998). Místem cirkadiánní syntézy melatoninu je parenchym epifyzy. Ten je skrze superioriální cervikální region míchy sympaticky inervován SCN, jehož činnost je díky retinohypotalamickému traktu seřizována do cirká 24hodinového cyklu. Produkce melatoninu je tak odrazem cirkadiánní rytmicity vnějšího světelného cyklu a tvoří informační spojník mezi vnějším cyklem a vnitřními hodinami organismu (Pevet and Challet, 2011).



Obr.6. Syntéza melatoninu z tryptofanu.  
Upraveno dle Mas et al., 2014

Na buněčné úrovni je signální kaskáda vedoucí k syntéze melatoninu zahájena noradrenergí aktivací  $\beta_1$  adrenergických receptorů vedoucí ke zvýšení [cAMP]<sub>i</sub>. Tento druhý posel následně zvýší aktivitu jednoho z enzymů, které jsou v syntéze melatoninu limitující, a to buď N-acetyltransferázy (AANAT) nebo serotonin N-acetyltransferázy (SNAT), mimo to zvýší samotnou expresi genu pro AANAT. Činností těchto enzymů je serotonin konvergován na N-acetylserotonin (NAS) a ten posléze enzymem acetyl serotonin N-methyltransferázou (ASMT), známý také jako hydroxyindol-O-methyl transferáza (HIOMT), na konečný produkt melatonin (Obr.6) (Singh and Jadhav, 2014). Za iniciace ranního světla nebo i rušivým nočním světlem se depolarizují gangliové buňky retiny a prostřednictvím stejné dráhy, která vede k produkci melatoninu, dochází ke snížení výlevu noradrenalinu a produkce melatoninu se tak potlačuje (Hattar et al., 2002). Inhibičně na syntézu melatoninu působí také glutamát, procesem zahrnujícím reciproční komunikaci mezi astrocyty a

pinealocyty, kdy glutamát aktivuje astrocyty a ty uvolňují TNF $\alpha$ , který následně signalizuje samotným pinealocytům (Villela et al., 2013).

Do procesu signální kaskády zasahuje mimo noradrenalinu i jeho kotransmitter ATP. Ten pozitivně působí skrze aktivaci P2Y<sub>1</sub> receptorů na enzym AA-NAT a zefektivňuje tak noradrenalinem indukovanou NAS syntézu. Studie Souza-Teodoro et al., 2016 ovšem překvapivě prokázala, že na rozdíl od zvýšené hladiny NAS se množství samotného melatoninu pod vlivem ATP snížilo, a to prostřednictvím snížení transkripce genu pro ASMT. Rozdílný vliv ATP na syntézu melatoninu a jeho prekursoru NAS tedy nejspíš není ani tak předmět zájmu hormonu jako spíš NAS samotného a jeho role v neuroprotektci a proliferaci (Souza-Teodoro et al., 2016). Ovšem i melatonin samotný představuje multifukční molekulu. Mimo role zjevného signálního posla s cirkadiánním charakterem chování zaujímá melatonin i výraznou protektivní pozici v rámci organismu. Melatonin a jeho metabolity působí antioxidačně a to přímo, kdy jsou samy metabolizovány volnými radikály (Galano et al., 2013; Singh and Jadhav, 2014), ale i nepřímo skrze aktivaci svých receptorů vedoucích ke zvýšení genové exprese antioxidačních enzymů (Kleszczyński et al., 2016; Martín et al., 2002b) či syntézy jiných antioxidantů (Singh and Jadhav, 2014). Takovým příkladem je melatonin aktivující MT1 receptory a inhibující tak buněčnou smrt v kulturách myších a lidských striatálních buněk spojených s mutací v huntingtinu (Wang et al., 2011). Melatoninový receptor MT2 zase snižuje oxidativní stres, zvyšuje neurogenezi a buněčnou proliferaci (Chern et al., 2012). Obecněji řečeno, neuroprotektčně se jeví v celé řadě chorob centrální nervové soustavy - epilepsii, depresi, Alzheimerově chorobě, Parkinsonově chorobě, migréně a insomnii, kdy se předpokládá, že právě snížená produkce melatoninu s věkem přispívá k slabé spánkové efektivitě, ale příznivě se také jeví i např. při léčbě obezity, drogových závislostí, onkologických onemocněních, diabetu, alopecii, poruchách imunity a reprodukčního systému (Liu et al., 2016; Singh and Jadhav, 2014). O špatně fungující epifyze se také uvažuje jako o jedné z biologických příčin autismu (Rossignol and Frye, 2014). Melatonin také působí jako regulační faktor v imunitním systému. Indukuje syntézu některých interleukinů a reguluje diferenciaci některých typů imunitních buněk. V CNS se melatonin podílí na řadě růstových procesů např. diferenciaci a maturaci neuronálních kmenových buněk, axogenezi nebo formování funkčních synapsí (Jockers et al., 2016). Rozbor celkové melatoninové agendy by ovšem byl natolik obsáhlý, že není cílem ani v možnostech této práce se jím v plné míře zabírat. Výčet v tomto odstavci je tedy především orientační.

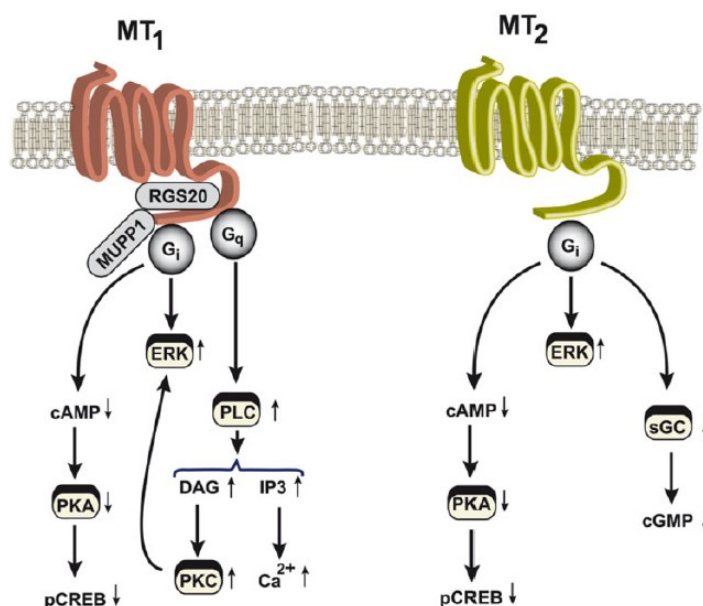
S ochrannou funkcí melatoninu může souviset i jeho syntéza v rámci CNS ovšem mimo dobře etablovanou epifyzu. Produkce melatoninu jsou schopny astrocyty kortexu, přestože



syntéza nevykazuje cirkadiánní rytmus a množství melatoninu je zhruba pětina toho, co je ke změření v rámci parenchymu epifyzy (Liu et al., 2007). K syntéze melatoninu dochází i v choroidním plexu, který obklopuje mozkové komory a uvolňuje biologicky aktivní molekuly do cerebrospinální tekutiny (Quintela et al., 2018). Pod kontrolou hodinových genů a tedy s cirkadiánním charakterem probíhá produkce melatoninu i v retině, jak bylo v *in vitro* experimentu prokázáno u křeččí sítnice (Tosini and Menaker, 1996).

### 3.5.2. Receptory

Melatoninové receptory savců patří mezi metabotropní typy a jsou tedy spjaty s G proteiny. Rozlišují se dva typy – MT1 a MT2 (Obr.7). Ty lidské vykazují zhruba 55% homologii a oba dva váží melatonin s vysokou afinitou. MT1 receptor je kódován genem *MTNR1A* přítomným na chromozomu 4q35.1 a pojí se s  $G_i$  a  $G_q$  proteiny. Jeho aktivace inhibuje produkci cAMP, aktivaci PKA a fosforylaci CREB. MT2 receptor je kódován *MTNR1B* genem přítomným na 11q21-q22 chromozomu. Pojí se s  $G_i$  proteinem a inhibuje tvorbu cAMP a cGMP, aktivuje PKC v SCN a snižuje  $Ca^{2+}$  dependentní výlev dopaminu v retině (Jockers et al., 2016).



Obr.7. Signální dráhy spojené s melatoninovými receptory. V závislosti na typu stimulovaného receptoru se aktivuje konkrétní signální dráha. DAG, diacylglycerol; ERK, kináza regulovaná extracelulárním signálem; IP3, inositoltrifosfát; MUPP1, multi-PDZ domén protein 1; pCREB, fosfoprotein vázající se na cAMP-response element; PLC, fosfolipáza C; PKA, proteinkináza A; PKC, proteinkináza C; RGS20, regulátor G protein signalizace 20; sGC, solubilní guanylylcykláza. Upraveno dle Tosini et al., 2014

Studie z roku 2015 zkoumající anatomické, ale i buněčné rozmístění melatoninových receptorů MT1 a MT2 odhalila, že receptory obsazují membrány neuronů po celém mozku potkana: *cortex*, *nuclei basales*, *hippocampus*, *corpus amygdaloideum*, *thalamus*, *epithalamus*, *hypothalamus*, *septum verum*, *corpus pineale*, *mesencephalon*, *substantia grisea centralis*, *pallidum ventrale*. Poměrové rozložení receptorů ovšem není ve výše zmíněných oblastech homogenní, ale specifické pro každou danou oblast, což potvrzuje specifické působení melatoninu v různých regionech mozku právě i např. skrze odlišně zastoupené receptory. Příkladem může být specifický výskyt pouze MT2 receptorů v *nucleus reticularis thalami*,

oblasti, kde jsou umístěny neurony řídící aktivitu související s řízením NREM spánku (angl. Non-rapid eye movement) (Baptiste et al., 2015).

Zmíněná studie také navíc potvrdila již dříve zjištěné poznatky o hustém zastoupení melatoninových receptorů v SCN a *pars tuberalis* šišinky (Baptiste et al., 2015; Hunt et al., 2001). Obrácením pozornosti přímo na SCN bylo na základě imunohistochemických studií prokázáno, že se jedná především o podtyp MT1 (Baptiste et al., 2015; Waly and Hallworth, 2015), jehož množství není v průběhu cirkadiálního cyklu statické, ale vzrůstá v čase subjektivního soumraku. Tehdy je signál detekovatelný nejenom na tělech neuronů, ale i na jejich dendritech a zasahuje tak až do optického chiasmatu (Waly and Hallworth, 2015) Také *in situ* hybridizace potvrdily, že výskyt mRNA *MT1* je zvýšený na přelomu dne a noci a také naopak (Poirel et al., 2002). Receptory MT2 se v SCN vyskytují také, oproti MT1 ovšem pouze v nepatrném množství (Dubocovich et al., 1998; Liu et al., 1997; Waly and Hallworth, 2015) po celý průběh cirkadiálního rytmu.

### 3.5.3. Působení melatoninu v SCN

Melatoninu, jeho produkci a výskytu v organismus, nelze upřít zřetelný cirkadiální charakter. V krvi savců, nehledě na nokturnální či diurnální nastavení živočicha, je detekovatelný pouze v noci a jak již bylo zmíněno výše, SCN je přímým činitelem regulující jeho syntézu v epifyze. Odtud se syntetizovaný melatonin dostává krevním řečištěm dále do organismu, mimo jiné i zpětnovazebnou smyčkou do centra biologických hodin (Gillette and McArthur, 1996), kde působí skrze přítomné membránové receptory, jak byly zmíněny v přechozím oddíle.

Z výsledků přinesených mnoha elektrofyziologickými studiemi lze vyvozovat, že obecným melatoninovým působením na neurony je potlačování jejich aktivity. Efekt, který byl skrze MT1 receptory potvrzen např. u neuronů spinálního ganglia (Oliveira-Abreu et al., 2018). Inhibičně však melatonin působí i na neurony v SCN, a to taktéž prostřednictvím MT1 (Liu et al., 1997). Hyperpolarizace melatoninem je navozená zvýšením membránové propustnosti pro draslíkové anionty (Jiang et al., 1995; van den Top et al., 2001) a inhibičně působí hormon i na dovnitř směřující kationtový proud aktivovaný právě při hyperpolarizaci membrány ( $I_h$ ), což celkově vede ke snížení excitability SCN neuronů (Jiang et al., 1995). Bylo však i prokázáno, že melatonin jako inhibiční činitel nepůsobí pouze postsynapticky, ale i presynapticky prostřednictvím zvýšení GABAergní transmise, tedy spíše v roli modulátoru než-li přímého agens (Scott et al., 2010).

Výše zmíněnými efekty melatonin působí nehledě a bez vlivu na cirkadiální rytmus. Jakou má ale melatonin roli v cirkadiálním orchestru biologických hodin? Při studiu geneticky

modifikovaných myší s poruchami melatonergní signalizace se prokázalo, že melatonin samotný tak jako jiný stimulus není pro zachování periodické činnosti SCN nezbytný (Pfeffer et al., 2012, 2017). Geneticky modifikované myši s narušeným melatonergním systémem jsou oproti kontrolám pouze více aktivní během dne (Homola et al., 2015). Také pinealektomie, tedy chirurgické odstranění epifyzy, má jen malý vliv na cirkadiánní aktivitu u savců (Quay, 1968). Nepřítomnost melatoninu v krvi nijak neovlivňuje proces synchronizace biologických hodin se světelným rytmem, rytmus v příjmu potravy ani rytmus generovaný samotným SCN (Houdek et al., 2016). V jiném experimentu ovšem bylo seřizení cirkadiánní lokomoční aktivity rozhozené v důsledku pásmové nemoci mnohem pomalejší u melatonin deficitních myší oproti kontrolám (Pfeffer et al., 2012). V podmínkách konstantní tmy zase vede pinealektomie ke snížení spontánní lokomoční aktivity a ke zkrácení periody cirkadiánního rytmu (Houdek et al., 2016). Podle zmíněných studií se tedy melatonin v případě absence světla, hlavního zeitgeberu<sup>2</sup>, podílí na zachovávání potřebné periody biologických hodin. Toho se využívá v klinické praxi u slepých jedinců neschopných detekovat světlo, u kterých se hormon užívá k seřizování jejich cirkadiánních rytmů, tak aby měli zachovanou ~ 24hodinnovou periodu fyziologického rytmu (Lewy et al., 2005). Za fyziologických podmínek se ovšem melatonin v interakci se SCN jeví spíše redundantní.

Nicméně tak jak bylo naznačeno výše, hormon je schopen cirkadiánní nastavení organismu regulovat. Seřizování cirkadiánní lokomoční aktivity bylo prokázáno v nespočtu studiích provedených na hlodavcích (Dubocovich et al., 1998, 2005; Jiang et al., 1995; Pfeffer et al., 2012). Toho se využívá v souvislosti s řadou chorob cirkadiánního rytmu. Melatonin a další agonisté melatoninových receptorů se tak užívají při pásmové nemoci (angl. jet lag), syndromu odkládané spánkové fáze (angl. Delayed sleep-phase disorder, DSPD), obdobně syndromu předběhlé spánkové fáze (angl. Advanced sleep phase disorder, ASPD), dále při sezonní afektivní poruše (angl. Seasonal Affective Disorder, SAD), práci na směny či poruše, při které jedinec nevykazuje fyziologický 24hodinový cyklus bdění a spánku (angl. Non-24h-sleep-wake disorder) (Liu et al., 2016).

Pod prizmatem předešlého odstavce se jako příhodná k prodiskutování jeví otázka interakce melatoninu a samotného SCN. Spontánní elektrická aktivita SCN prochází v průběhu cirkadiánního cyklu specifickými proměnami. Svých nejvyšších hodnot dosahuje během dne, a naopak v průběhu noci klesá k těm nejnižším (McArthur et al., 1991). Melatonin je schopen za určitých podmínek průběh fáze tohoto pravidelného rytmu ovlivnit. V čase tzv. citlivostních

---

<sup>2</sup> Exogenní nebo endogenní faktor, který je schopen indukovat posun fáze cirkadiánního rytmu

oken zahrnující subjektivní soumrak a subjektivní svítání (Gillette and McArthur, 1996) je aplikovaný melatonin schopen *in vitro* posunout cirkadiánní aktivitu SCN neuronů, v závislosti na dávce a délce aplikace (Hunt et al., 2001; McArthur et al., 1997).

Mechanismus ležící za tímto efektem není plně objasněný, přestože je známo, že je zprostředkován G proteiny a zahrnuje aktivaci PKC (McArthur et al., 1997; Rivera-Bermúdez et al., 2003). S G proteiny jsou asociovány oba receptory přítomné v SCN, MT1 a MT2. Stále ovšem panují kontroverze ohledně otázky, který z nich, případně jestli oba dva, jsou odpovědné za fázový posun. Ačkoli k problematice existuje celá řada studií, liší se metodologickým přístupem i modelovými organismy, což může být problematické při farmakologickém zkoumání melatoninových receptorů. Je totiž známo, že selektivita jednotlivých melatoninových ligandů se významně liší mezidruhově. Navíc, farmakologie může být limitující i z hlediska nedostatku specifických ligandů pro MT1. Využívá se tedy především selektivních ligandů MT2 receptorů, mezi kterými je za zlatý standart považován antagonist 4P-PDOT (4-fenyl-2-propionamidotetralin) (Liu et al., 2016). Pro inhibici melatoninových efektů obecně se využívá neselektivního antagonisty luzindolu a cenným nástrojem na identifikaci receptorů jsou radioligandy, především 2-<sup>125</sup>I-iodomelatonin, který je vysokoafinitní molekulou jak pro MT1, tak pro MT2 (Jockers et al., 2016).

Studie zabývající se fázovým posunem pod vlivem melatoninu poukazují především na klíčovou roli MT2 receptoru. Jednak, v *in vivo* experimentu provedeném na myších byl efekt posunu fáze lokomoční aktivity inhibován při aplikaci 4P-PDOT (Dubocovich et al., 1998). Dále, funkční MT2 receptor, ale ne MT1 receptor, je klíčový pro adaptaci lokomoční aktivity myši v experimentu imitující pásmovou nemoc (Pfeffer et al., 2012). Zmíněný MT2 antagonist 4P-PDOT také blokoval posun fáze neuronální aktivity *in vitro* na SCN neuronech potkana (Hunt et al., 2001). Další studie provedená na myších s knockoutem receptoru MT1 (MT1 KO) ukázala, že u zvířat pod vlivem melatoninu nedošlo k posunu fáze rytmu lokomoční aktivity, nicméně paradoxně došlo *in vitro* k posunu fáze neuronální aktivity jejich SCN neuronů (Dubocovich et al., 2005). Ke stejnému závěru dospěla i dřívější studie provedená Liu et al., 1997, která také pracovala s MT1 KO a také u nich neměl MT1 receptor limitující roli ve fázovém posunu (Liu et al., 1997). Nicméně Liu et al., 1997 také ukázal, že posun fáze byl u MT1 KO menší oproti kontrolám, což spolu se studií Dubocovich et al., 2005 naznačuje, že k posunu fáze je zapotřebí i participace MT1 receptoru. Jak bylo již nadneseno, z výše uvedených studií vyplývá, že neuronální posun fáze je pravděpodobně zprostředkován MT2 receptory, na druhou stranu přinejmenším v *in vivo* stavu je nejspíš zapotřebí i participace MT1 receptoru (Dubocovich et al., 2005). Tato otázka je ovšem zatím předmětem diskuzí. Je známo,

že melatoninové receptory tvoří heterodimery, které u myších fotoreceptorů regulují citlivost na světlo a spouští PLC/PKC signální kaskádu (Baba et al., 2013). Tento efekt není vyvolán u homozygotních MT1 a MT2 KO a stejně tak ani u myší, u kterých byla navozena overexprese nefunkčních MT2 receptorů. Nezdá se nicméně pravděpodobné, že by to byl případ i SCN, vzhledem k tomu, že posun fáze *in vitro* byl pozorován i při MT1 KO myši (Dubocovich et al., 2005).

Jak bylo zmíněno výše, v souvislosti s klinickou praxí aplikovat melatonin, ale i jeho syntetické ligandy jako agomelatin, ramelteon a tesimelteon (Liu et al., 2016) ve škále cirkadiálních dysbalancí, je melatonin schopen seřizovat lokomoční aktivitu jedinců. Předchozí odstavec se také zmiňuje o schopnosti melatoninu ovlivňovat elektrickou aktivitu neuronů SCN (Hunt et al., 2001; McArthur et al., 1997). Ovšem efekt na genový aparát hodinových genů je stále kontroverzní. Melatonin by mohl být analogizován s jinými dvěma faktory, které obdobně jako melatonin posouvají fázi cirkadiálního rytmu, a tím je světlo a glutamát (daný efekt je závislý na fázi cirkadiálního rytmu, večer dochází ke zpoždění cyklu, ráno k jeho předběhnutí). U obou dvou byl v SCN prokázán vliv na transkripci *Per1* a *Per2* (Akiyama et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001). Melatonin sám je úspěšný v navození exprese *Cry1* v *pars tuberalis* (Dardente et al., 2003) či genů *Per2* a *Per3* u kuřecích astrocytů mezimozku (Paulose et al., 2009). SCN se ovšem jeví odlišně a výsledky jsou rozporuplné. Například v *in vivo* studii u ptačího druhu *Coturnix japonica* melatonin, jak konstantě zvýšený v krevní plazmě, tak jeho jednorázová aplikace v čase citlivostního okna, nezpůsobila nikterak změněnou expresi zkoumaných hodinových genů v SCN (Yasuo et al., 2002). Stejně tak neovlivnila expresi hodinových genů v SCN ani pinealoktomie (Houdek et al., 2016). Při jiném experimentu byla na přelomu subjektivního dne a noci pod vlivem melatoninu *in vitro* prokázána zvýšená transkripce genů *Per1* a *Per2* (Kandalepas et al., 2016), tedy efekt, který byl popsán jako nezbytný u posunu fáze světlem nebo glutamátem (Akiyama et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001). Ovšem jiná, tentokrát *in vivo*, studie Poirel et al., 2003 provedená na Wistar potkanech podobně jako studie Yasui et al., 2002 neprokázala přímý vliv na expresi genů po aplikaci melatoninu. Druhý den po melatoninové injekci nicméně výzkumníci zjistili odlišný průběh exprese u genů *Per1*, *Per3*, *Bmal1* a *AVP* (Poirel et al., 2003). Zdá se tedy nasnadě, že melatonin ovlivňuje molekulární mechanismus biologických hodin spíše na posttranslační než na transkripční úrovni. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že seřizování biologických hodin na posttranslační úrovni je možné, konkrétně v rovině interakce klíčové PKC $\alpha$  a PER2 (Jakubcaková et al., 2007). Melatonin je také úspěšný v regulaci rytmu jiných dvou klíčových komponent molekulárních hodin, a to sice *ror $\beta$*  a *rev-erba*, které obě hrají významnou regulační

roli rytmu (Agez et al., 2007). Nejeví se tedy nezbytné, aby byl melatonin pro své seřizovací účinky schopen přímo ovlivňovat genovou expresi.

#### 3.5.4. Interakce melatoninu a astrocytů

Předchozí kapitola se věnovala vlivu melatoninu na SCN celkově a vycházejí z dostupných studií, byla zaměřena především na neurony. Nicméně ani astrocyty obecně nejsou podle všeho k hormonu netečné, a co víc, konkrétní efekt melatoninu je závislý na místě, kde se cílové buňky vyskytují a také, kterého organismu jsou součástí (Peters et al., 2005).

Několikrát bylo prokázáno, že astrocyty exprimují některý či některé z melatoninových receptorů (Adachi et al., 2002; Das et al., 2008; Peters et al., 2005). Průkazný je vliv melatoninu na astrocytární metabolismus, nemusí být však nutně pod taktovkou cirkadiánních rytmů. Například studie z roku 2002 ukázala, že na přítomnosti melatoninu byl závislý cirkadiánní výdej glukózy z kultur kuřecích astrocytů, stejně tak jako cirkadiánní exprese hodinových genů *Per2* a *Per3* (ne však hodinového genu *Cry1*), v přítomnosti melatoninu došlo ovšem u kultur i rychlejšímu růstu (Paulose et al., 2009). Efekt melatoninu na proliferaci byl prokázán i u myších astrocytů, kdy signální kaskáda vedla přes iniciaci Akt fosforylace a aktivace transkripčního faktoru CREB až ke zvýšení exprese neurotrofního faktoru GDNF (angl. Glial cell-derived neurotrophic factor) (Kong et al., 2008). Utilizaci glukózy, uvolňování glykolytických produktů pyruvátu a laktátu do extracelulárního prostoru a tvorbu glykogenu a glykoproteinů je melatonin v souvislosti s cirkadiánním rytmem schopen regulovat i u kuřecích astrocytů mezimozku (Adachi et al., 2002). A to ve směru snížení příjmu glukózy astrocyty a stejně tak i snížení uvolňování pyruvátu a laktátu. Opačně pak melatonin působí na tvorbu energetických zásob. Hormon se tak ve světle těchto faktů jeví jako perspektivní v řízení přechodu mezi glykolytickým metabolismem, který je převládající během dne a který zásobuje energetickým substrátem neurony, a naopak ukládání energetických zásob během noci (Adachi et al., 2002).

Vedle výše zmíněného metabolického zapojení figuruje melatonin ve vztahu k astrocytům stejně jako k řadě dalších buněk jako protektivní faktor. Aplikace melatoninu působí preventivně vůči excitotoxicitě a oxidativnímu poškození astrocytárních buněk, zvyšuje transkripci MT1 a cytoprotektivně působí prostřednictvím zabránění růstu  $[Ca^{2+}]_i$  a aktivitě proapoptických molekul (Das et al., 2008). Také v ischemických podmínkách jak *in vitro* tak *in vivo* melatonin zvyšuje životaschopnost astrocytů (Borlongan et al., 2000). Melatonin také potlačuje aktivaci gliových buněk tzv. astrogliózu, která doprovází poškození mozku a vede k tvorbě škodlivého množství prozánětlivých cytokinů (Babae et al., 2015; Hashem, 2018).

Přes studie zabývající se benefičním či jiným vlivem melatoninu na astrocyty, ovšem není známo, jestli a jak melatonin reguluje astrocyty v SCN.

#### 3.5.5. Vliv melatoninu na produkci ATP

Hlavním zdrojem ATP v buňkách je oxidativní fosforylace mitochondrií, což jsou organely, které jsou s melatoninem spojené hned v několika rovinách. V mitochondriích probíhá syntéza i metabolismus melatoninu (Tan et al., 2016). Mimo to, existuje také mnoho studií, kdy melatonin působí na mitochondrie protektivně a tedy i protektivně vůči snížení produkce ATP působením řady nepříznivých vlivů jako oxid dusnatý (López et al., 2006), UV záření (Kleszczyński et al., 2016), arsenit (Teng et al., 2015) nebo ischemicko/reperfúzní poškození (Yang et al., 2013). U jaterních a mozkových mitochondrií potkana melatonin zvyšuje aktivitu komplexu I a IV a celkově tak navyšuje produkci ATP (Martín et al., 2002a). Melatonin také regulačně působí na mitochondriální potenciál ( $\Delta\psi$ ), který je zásadní v procesu tvorby ATP. Při vápníkovém stresu zabraňuje melatonin ustavení proapoptického póru, tím zachovává membránový potenciál a umožňuje tak zachování syntézy ATP (Jou, 2011). Naopak aktivně působí melatonin na uncoupling proteiny (UCPs) (Tan et al., 2011). Aktivace UCPs vede k přesunu protonů do matrix a dochází k redukci  $\Delta\psi$ , tím se také zabraňuje úniku elektronů z elektronového přenašečového systému a zvyšuje se tak produkce ATP. Melatonin tedy blokuje tvorbu proapoptického póru a tím zachovává  $\Delta\psi$  za stresových podmínek a naopak aktivuje UCPs a tím mírně redukuje  $\Delta\psi$  za normálních podmínek, v obou případech má jeho působení příznivý vliv na produkci ATP (Tan et al., 2016).

#### 4. Cíle diplomové práce

Cílem diplomové práce bylo popsat vliv melatoninu na akumulaci extracelulárního ATP v SCN potkana měřenou v modelu organotypických kultur. Vzhledem k zaměření na specifické receptorové účinky melatoninu, byly v práci používány nanomolární až subnanomolární koncentrace melatoninu. Experimenty s melatoninem probíhaly ve dvou odlišných modelech, v jednom, kdy byl melatonin aplikován pouze jednorázově, v časovém okně odpovídajícím senzitivitě SCN k melatoninu, a v druhém, kdy byl melatonin v médiu u organotypických kultur přítomen po celou dobu experimentu. Vše směřovalo k odhalení účinku melatoninu na amplitudu a fázi sekrečního rytmu ATP, a odvození specifčnosti, s jakou melatonin na SCN působí.

Přídavným cílem bylo také popsat podíl neuronové populace v SCN na tvorbě ATP rytmu a pokusit se odhadnout, zda může melatonin ovlivnit ATP rytmus působením na neurony. Za tímto účelem byly organotypické kultury vystaveny vlivu TTX, který specificky blokuje napětově řízené  $\text{Na}^+$  kanály a inhibuje tak elektrickou aktivitu neuronů.



## 5. Materiál a metody

### 5.1. Základní informace

#### *Zvířata*

V experimentech byli použiti potkani kmene Wistar, jak samci, tak samice, staří v rozmezí 16–21 dní. Potkani byli chováni v 12-12 light-dark cyklu se světelnou fází od 6 hodin ráno do 6 hodin odpoledne. Potravu i vodu měla zvířata k dispozici *ad libitum*.

#### *Roztoky*

Roztok GBSS (Gey's Balanced Salt Solution; Sigma-Aldrich s.r.o.) byl použit na první ošetření vyjmutého mozku z lebeční struktury. Byl zchlazen na ledu (4°C) a prokysličen (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>).

Směs média Neurobasal A + 2% roztok B-27 Supplement, serum free + 1% roztok Penicilin-Streptomycinu (10,000 U/mL) + 0,4% roztok L-glutaminu (vše Gibco; Thermo Fisher Scientific) byla použita ke kultivaci organotypických kultur. Obohacené médium bylo saturováno směsí 95% vzduch + 5% CO<sub>2</sub>.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich s.r.o.) byl použit jako experimentální roztok ke kultivaci řezů během probíhajícího pokusu.

Jako aplikační média byl využit melatonin a tetrodotoxin (oboje Tocris Bioscience).

### 5.2. Organotypické kultury

Organotypické kultury představují významnou *in vitro* metodu, která díky zachovalé synaptické a strukturní organizaci tkáně umožňuje studovat komplexitu systému a blíží se tak *in vivo* podmínkám. Metoda, která byla využita při této diplomové práci zahrnuje kultivaci organotypických kultur na semipermeabilní membráně (BD Bioscience-Falcon; 1,0 µm). Kultivační médium je umístěné pod membránou s kulturou, tak že tkáň není v tekutině zalita, pouze je pokryta jejím filmem. Připravené organotypické kultury je nutné nechat jistou dobu kultivovat, v aplikovaném experimentálním designu se počítalo s jedním týdnem, tak aby se tkáň stabilizovala a byly odstraněny odumřelé buňky (Humpel, 2015). Tkáň postupem času průsvitní, ztenčuje se až do dosáhnutí stavu o několika málo vrstvách buněk a zbylé přeživší buňky se částečně rozprostírají do přilehlých oblastí. V takovém stavu lze organotypickou kulturu týdně udržovat (Tominaga et al., 1994).

### 5.2.1. Příprava a kultivace organotypických kultur

Potkani byli usmrceni dekapitací a mozek byl po odstřížení hlavových nervů vyjmut z lebeční dutiny a následně byl zchlazen GBSS (Sigma-Aldrich s.r.o.). Z mozku byl dvěma paralelními řezy vyříznut blok tkáně nad optickým chiasmatem, tak aby vzniklá část obsahovala SCN podél 3. mozkové komory. Nadbytečná tkáň na obou laterálních a dorzální straně byla také odstraněna, tak že vznikl hranolek rozměrově  $\sim 3 \times 3 \times 2$  mm. Tento blok tkáně byl posléze nařezán na vibratomu (Microslicer DTK-1000) a výstupem tedy byly 3 řezy o  $\sim 300\text{--}350$   $\mu\text{m}$  obsahující SCN. Tyto řezy byly přeneseny na membrány, které byly předem ošetřeny poly-L-lysinem (Sigma-Aldrich s.r.o.) a byly umístěny na 6ti místných platech (BD Biosciences-Falcon). Každá membrána obsahovala řezy pouze jednoho zvířete. Membrány s organotypickými kulturami byly zality 2 ml Neurobasalu A a uloženy v inkubátoru (5% CO<sub>2</sub> atmosféra; 37°C). V inkubátoru byly inkubovány 7 dní s výměnou média po třech dnech, tak aby se organotypické kultury před samotným měření ATP dostatečně stabilizovaly.

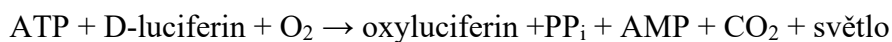
### 5.3. Měření koncentrace ATP

Koncentrace extracelulárního ATP byla stanovena bioluminiscenční analýzou. Před samotným měřením byly kultury v 8:00 hod. promyty DMEM (Sigma-Aldrich s.r.o.) a poté byly 4 hodiny inkubovány (5% CO<sub>2</sub> atmosféra; 37°C) v čerstvém DMEM.

ATP produkce do extracelulárního prostoru byla měřena každé 4 hodiny po dobu 24-48 hodin. V 12:00 hod. byl odebrán 1. vzorek zaujímající celý objem inkubující tekutiny organotypických kultur (1 ml) a byl nahrazen čerstvým objemem (1 ml) DMEM. Stejným postupem se médium vyměňovalo každé 4 hodiny. Vzorky byly uskladněny 3 dny při -20°C a následně byla stanovena hladina ATP. U organotypických kultur, které byly pod vlivem aplikačního média, probíhala výměna aplikačního média obdobně, pouze s přidáním aplikace dle experimentálního designu.

#### 5.3.1. Bioluminiscenční stanovení hladiny ATP

Ke stanovení [ATP]<sub>e</sub> byl použit ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Hoffmann-La Roche AG). Principem je měření intenzity světla, které je přímo úměrné množství ATP v roztoku. Světlo je produkováno reakcí luciferázy katalyzující oxidaci luciferinu podle rovnice:



Reakce poskytuje stabilní světelný signál po dobu několika minut a je tak vhodná i pro měření nízkých koncentrací ATP. Měření ATP pomocí ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II je citlivostí designováno pro rozmezí  $10^{-6}$ – $10^{-11}$  M ATP.

#### 5.4. Experimentální design

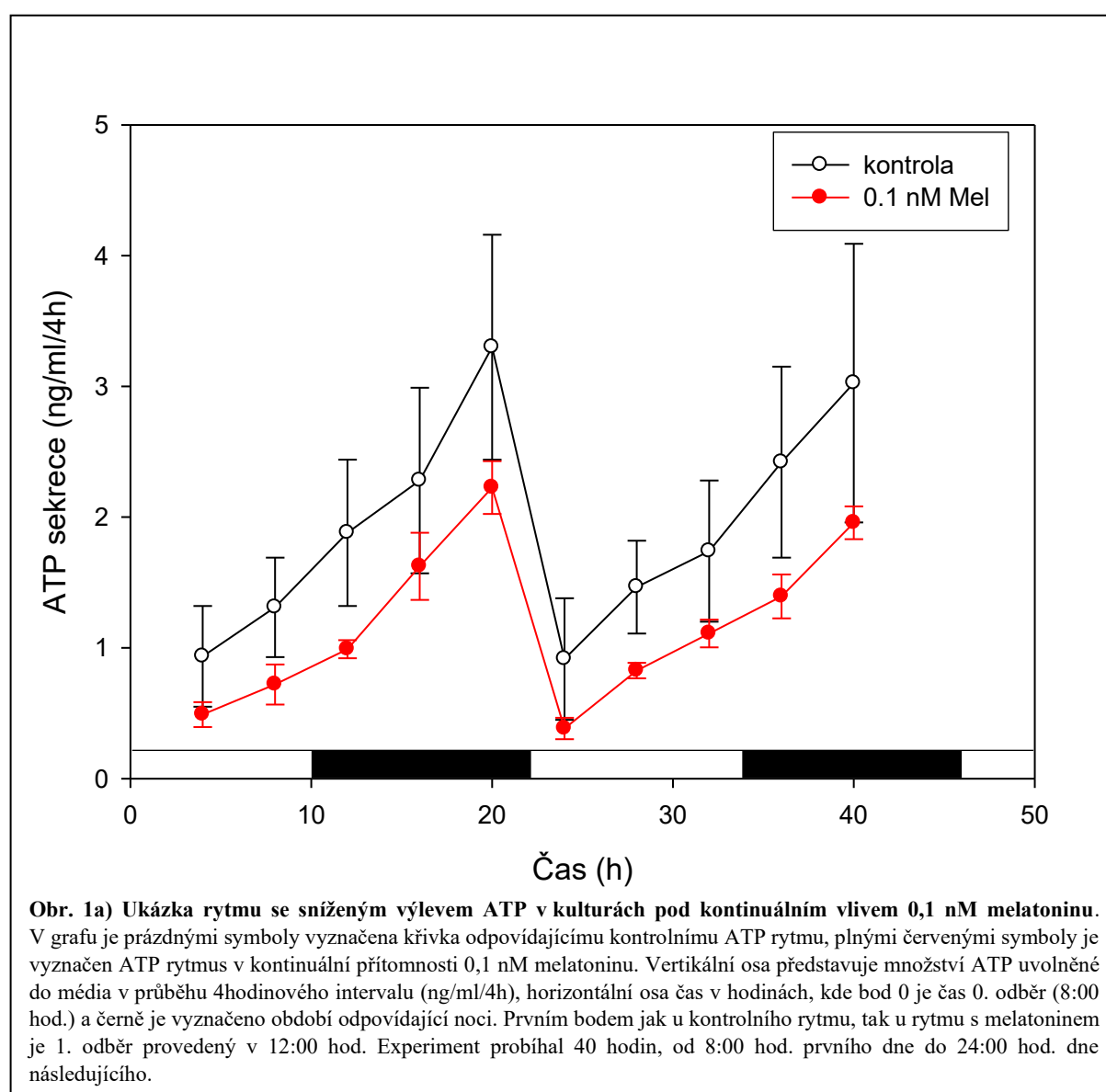
Každý experiment byl proveden na max. 12 souborech nezávislých organotypických kultur připravených z max. 12 zvířat. Minimálně 3 soubory organotypických kultur byly použity jako kontroly, zbytek pak byl využit do experimentu s aplikačními médii. Celá délka experimentu byla vždy minimálně 24 hodin, tak aby pokryla celý průběh cirkadiálního cyklu. Jako aplikační média byl využit melatonin v receptorových koncentracích 0,1 – 10 nM a tetrodotoxin v koncentraci 100 nM, který blokuje přenos akčního potenciálu. Oba typy aplikací byly u kultur přítomny buď po celou dobu experimentu anebo byly aplikovány pouze jednorázově v 16:00 hod., v čase, kdy je SCN pod vlivem stimulů schopno změnit fázi svého rytmu.

#### 5.5. Analýza a statistické zpracování dat

K analýze dat z bioluminiscenční analýzy byl využit program Winlana. Ten na základě známých koncentrací ATP sestavuje kalibrační křivku, kterou následně prokládá hodnoty naměřeného signálu z média o neznámé koncentraci. Statistické zpracování bylo provedeno v programu SigmaPlot. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry  $\pm$  SEM. Signifikantní rozdíly byly vypočítány pomocí párového Studentova T-testu ( $P < 0,05$ ).

## 6. Výsledky

Rytmus v akumulaci extracelulárního ATP lze měřit v modelu organotypických kultur SCN, a to po dobu nejméně 36 hod., kde perioda rytmu představuje ~ 24 hod. (Obr. 1a). Dle vzorků média, které byly odebírány v pravidelných 4hodinových intervalech bylo změřeno, že nejvyšší hladiny dosahuje kontrolní rytmus mezi 4.–5. odběrem, časově odpovídající období mezi 24:00–4:00 hod., i.e. cirkadiánnímu času (CT)<sup>3</sup> 18–22, nejnižší hladina je měřitelná hned následující interval mezi 5.–6. odběrem odpovídající ranním hodinám mezi 4:00–8:00 hod. následujícího dne, i.e. CT 22–2. Tyto výsledky ukazují, že ATP rytmus má opačný průběh než AVP rytmus, který nejvyšších hladin dosahuje přibližně ve 12:00 hod. (Svobodova et al., 2003).

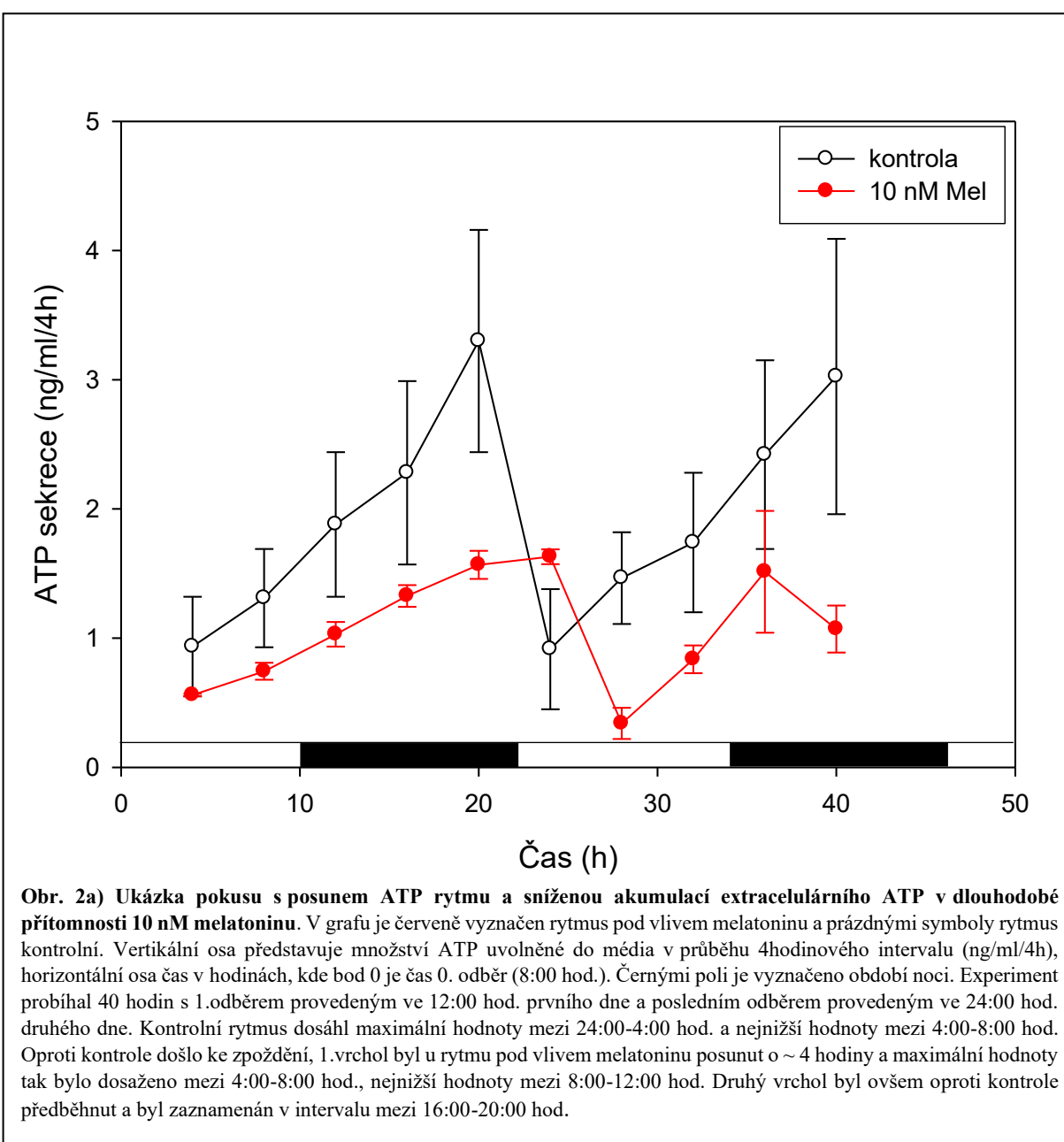


<sup>3</sup> Cirkadiánní čas (CT) je standartizované označení času (CT 0–24), které je vztaženo k fázi cirkadiánního rytmu; počátek subjektivního dne, i.e. CT 0, odpovídá v diplomové práci času 6:00 ráno

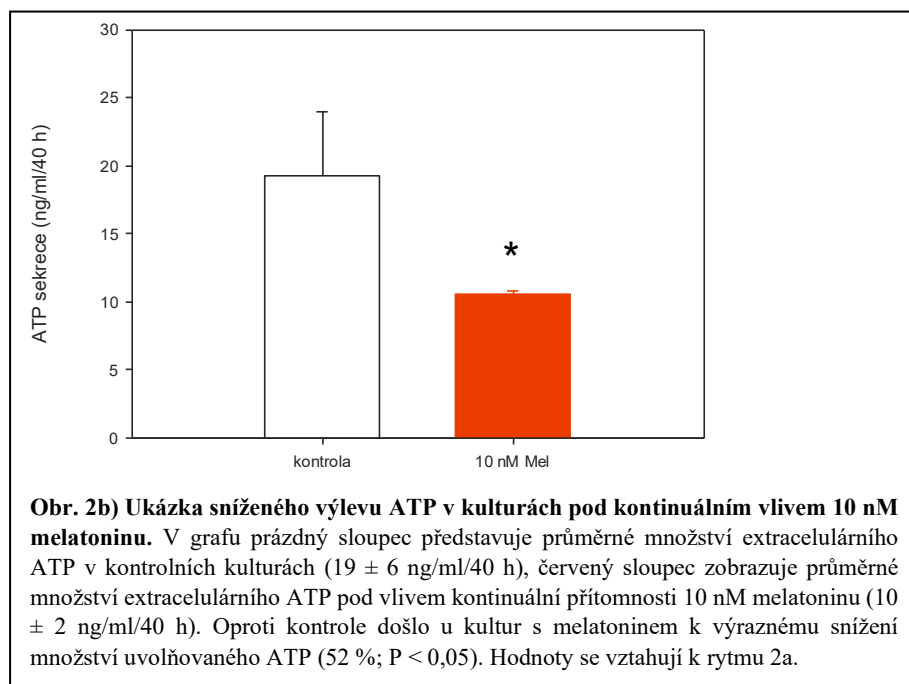
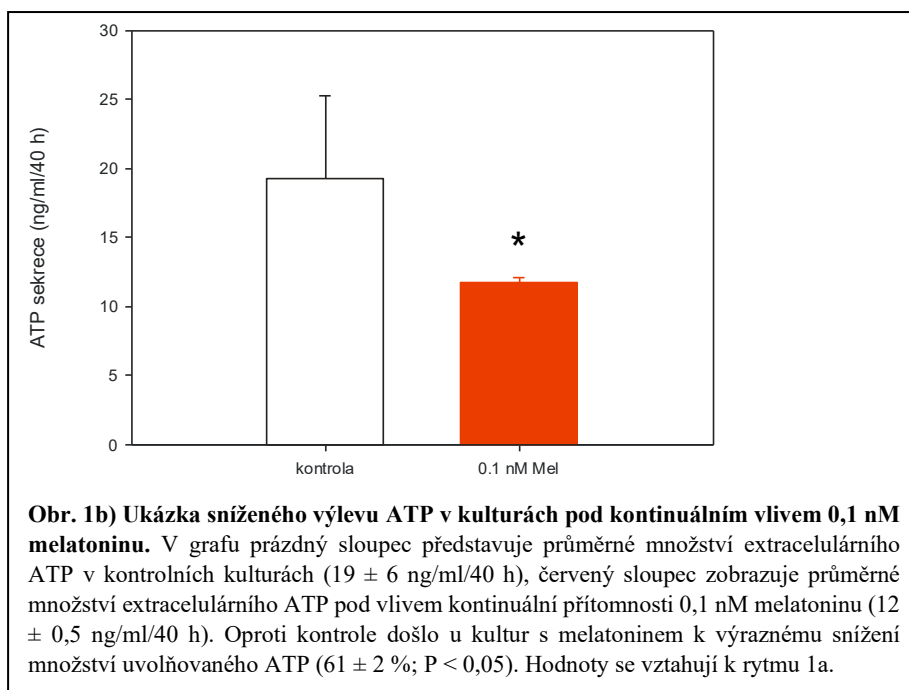
Po celou dobu pokusu se v experimentálním médiu vždy vyskytuje basální hladina ATP, která je nenulová. Množství extracelulárního ATP v amplitudě se v kontrolních kulturách pohybuje od 1,5–5 ng/ml/4h. ATP rytmus byl stabilně pozorován v 86 % pokusech ( $n = 14$ ). V ostatních 14 % pokusů nevykazovala ATP akumulace rytmus nebo byl pozorován rytmus s atypickou fází a tyto pokusy nebyly dále vyhodnocovány.

#### 6.1. Vliv kontinuální přítomnosti melatoninu na rytmus extracelulárního ATP

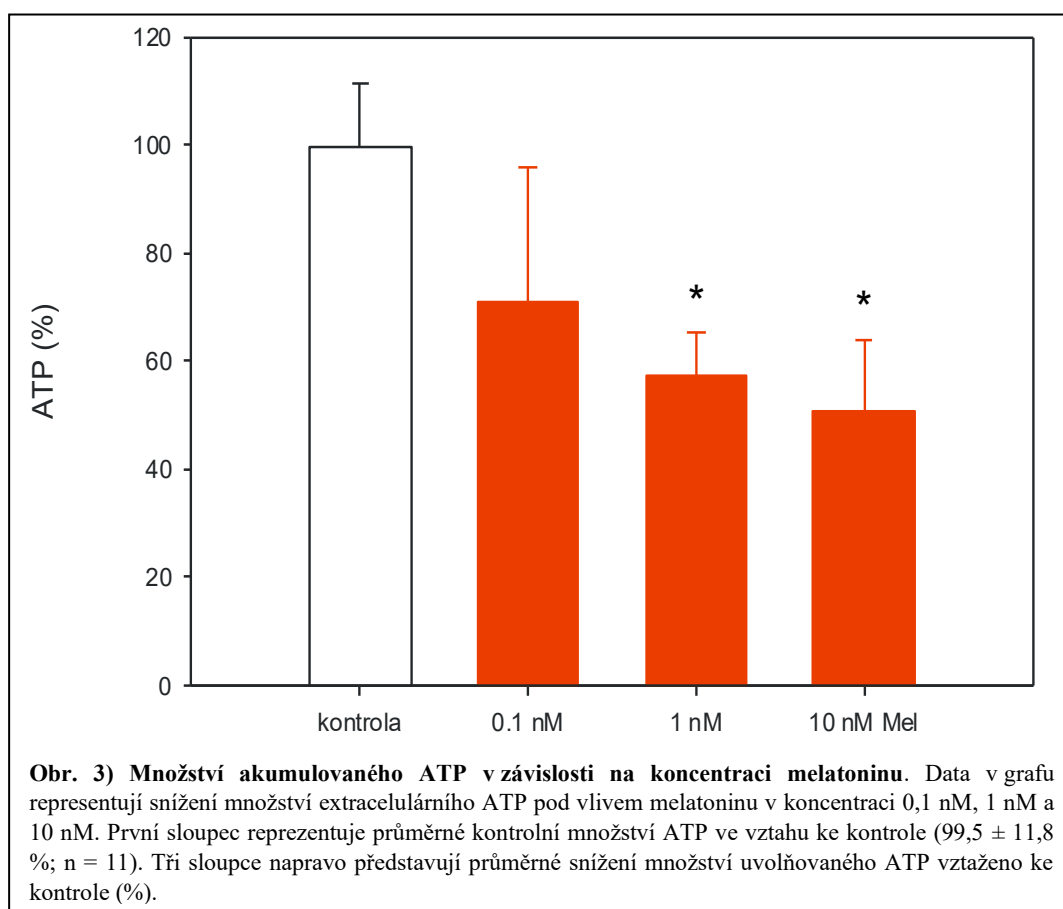
Rytmus ATP byl měřen v kontinuální přítomnosti melatoninu (0,1–10 nM) v médiu. S takovým designem byl tedy melatonin přidáván ke kulturám s každým odběrem a výměnou experimentálního roztoku. Rytmus byl desynchronizován u 37 % organotypických kultur



(n = 24). K posunu fáze rytmu došlo u 38 % organotypických kultur. V případě posunu, byl vrchol rytmu pod vlivem melatoninu posunut oproti kontrole o ~ 4 hodiny a maximální hodnoty tak bylo dosaženo mezi 4:00–8:00 hod. ráno (CT 22–2), nejnižší hodnoty mezi 8:00–12:00 hod. (CT 2–6) (Obr. 2a). Vedle zpoždění byl u kultur (25 %; n = 24) zaznamenán i vrchol kolem 20:00 hod. (CT 14) odpovídající možnému fázovému předběhnutí. Ve zbylých organotypických kulturách vykazoval rytmus atypický průběh odpovídající jak stavu s posunem, tak bez posunu nebo byl rytmus zachován bez posunu a probíhal tak paralelně s kontrolním rytmem (Obr. 1a).

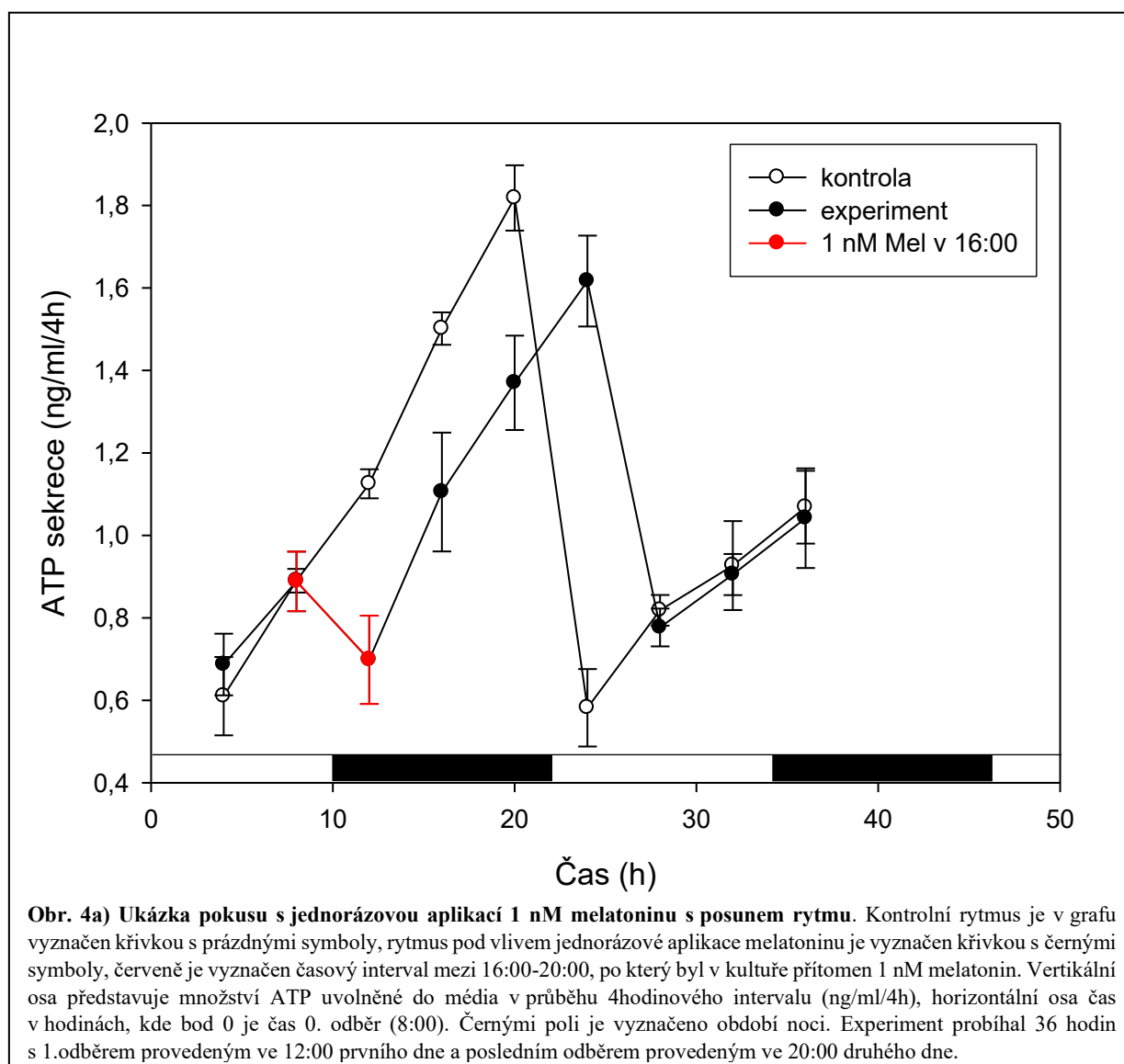


V jednotlivých experimentech byla měřena průměrná celková akumulace extracelulárního ATP v průběhu celého pokusu. Oproti kontrole, došlo vždy pod vlivem melatoninu k výraznému snížení množství uvolněného ATP (Obr. 1b, Obr. 2b). Rytmus byl inhibován po celou dobu měření. Velikost inhibice akumulovaného ATP byla přímo úměrná koncentraci aplikovaného melatoninu (Obr. 3). Pod vlivem melatoninu v koncentraci 0,1 nM bylo snížení  $71,1 \pm 24,7 \%$  ( $n = 3$ ;  $P > 0,05$ ) oproti kontrole, v případě 1 nM bylo snížení  $57,2 \pm 8,3 \%$  ( $n = 5$ ;  $P < 0,05$ ) a v případě 10 nM bylo snížení  $50,7 \pm 13,2 \%$  ( $n = 5$ ;  $P < 0,05$ ).

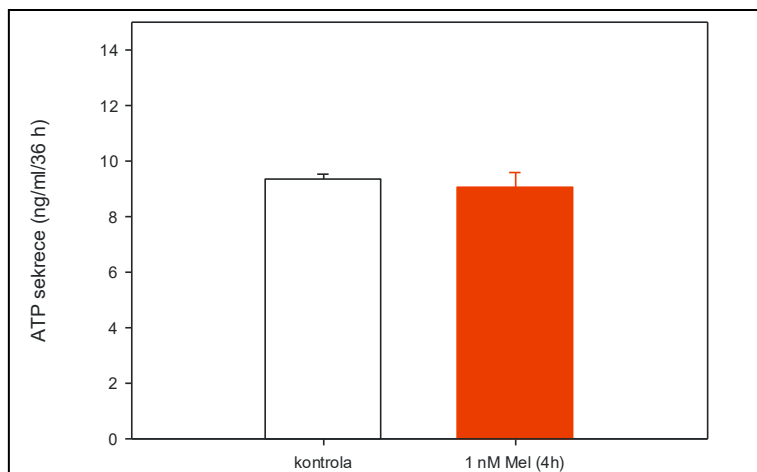


## 6.2. Vliv jednorázové aplikace melatoninu v 16:00 hod. na rytmus extracelulárního ATP

Melatonin je znám svou schopností posunout fázi cirkadiálního rytmu v SCN, působí-li ve specifickém citlivostním oknu. Ty jsou dvě, definované na přelomu světelných fází cyklu. Z tohoto důvodu byla jako doba aplikace melatoninu vybrán čas 16:00 hod. odpoledne, odpovídající CT 10 a spadající do citlivostního okna CT 9–11 (Rivera-Bermúdez et al., 2003), která byla efektní i při navození posunu AVP rytmu pod vlivem melatoninu (Svobodova et al., 2003). Kontrolní rytmus měl typický průběh ATP rytmu s nejvyšší hladinou  $[ATP]_e$  mezi 24:00–4:00 hod. (CT 18–22) odpovídající intervalu mezi 4.–5. odběrem a nejnižší hladinou  $[ATP]_e$  mezi 4:00–8:00 hod. (CT 22–2) hned v následujícím intervalu (Obr. 4a). Při aplikaci melatoninu došlo u všech kultur ( $n = 22$ ) k akutní inhibici výlevu ATP. U 64 % organotypických kultur došlo ke zpoždění fáze rytmu oproti kontrole o ~ 4 hodiny, vrcholu tak bylo dosaženo mezi 4:00–8:00 hod. (CT 22–2) a nejnižší hladiny v následujícím intervalu mezi 8:00–12:00 hod. (CT 2–6) (Obr. 4a).

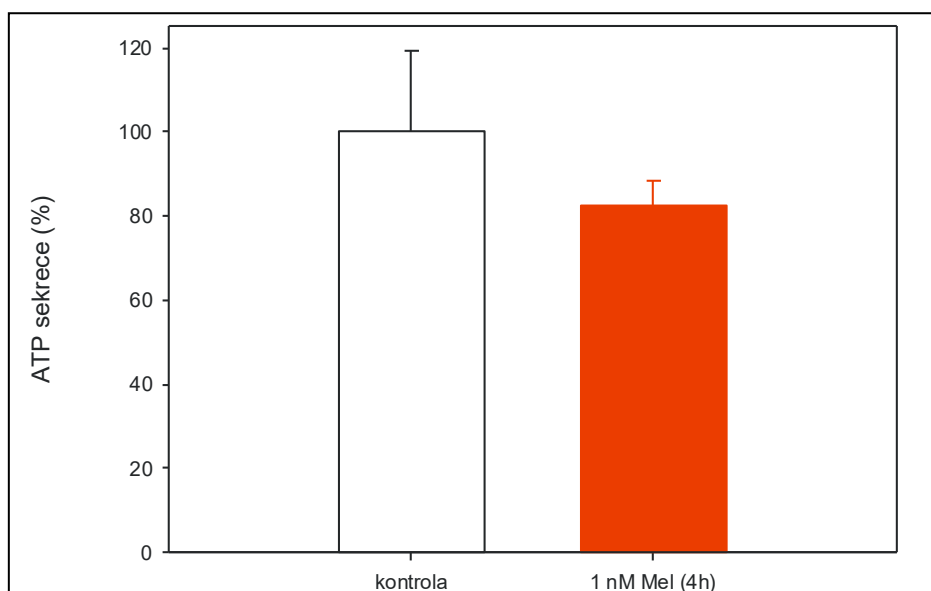






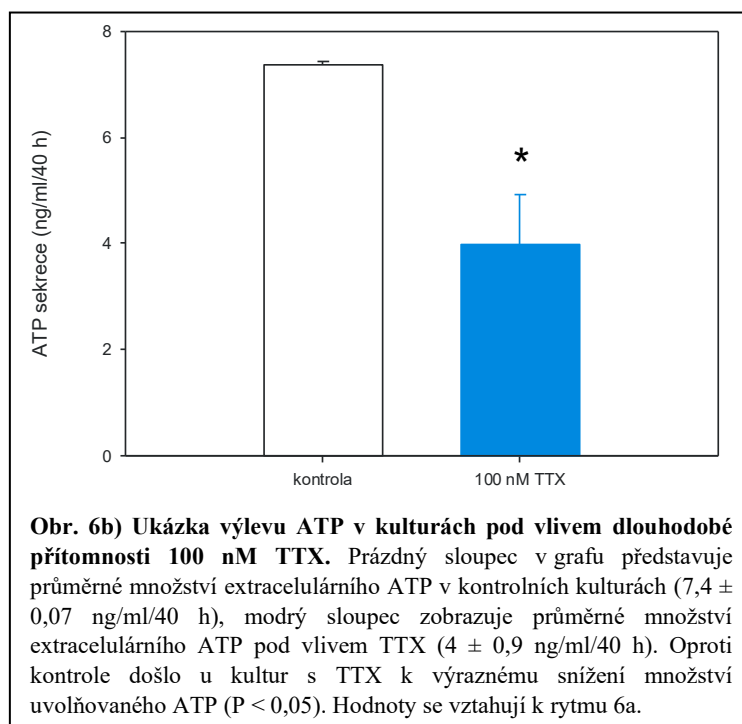
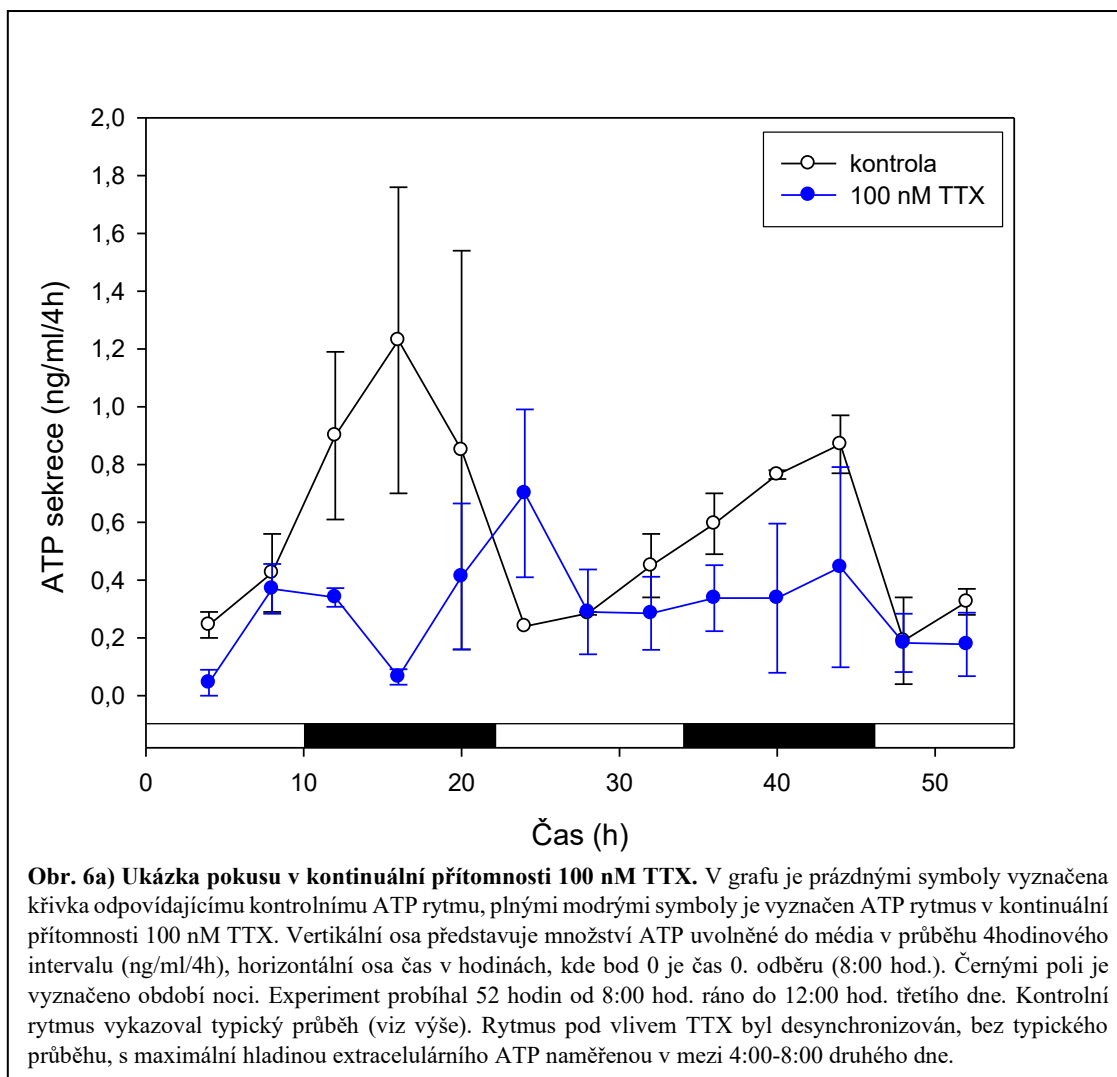
**Obr. 4b) Ukázka výlevu ATP v kulturách pod vlivem jednorázové aplikace 1 nM melatoninu.** Prázdný sloupec v grafu představuje průměrné množství extracelulárního ATP v kontrolních kulturách ( $9,3 \pm 0,2$  ng/ml/36 h), červený sloupec zobrazuje průměrné množství extracelulárního ATP pod vlivem melatoninu ( $9,1 \pm 0,5$  ng/ml/36 h). Oproti kontrole nedošlo u kultur s melatoninem k výraznému snížení množství uvolňovaného ATP. Hodnoty v grafu se vztahují k rytmu 4a.

Vlivem jednorázové aplikace melatoninu v 16:00 hod. (CT 10) došlo ke snížení průměrného množství uvolňovaného ATP ( $82,6 \pm 5,6$  %;  $n = 5$ ) oproti kontrole, nicméně výsledek není signifikantní (Obr. 5), na rozdíl od výsledků dosažených v dlouhodobé přítomnosti melatoninu. V ostatních kulturách (36 %;  $n = 22$ ) k posunu nedošlo a rytmus probíhal paralelně s kontrolním bez snížení množství akumulovaného extracelulárního ATP.

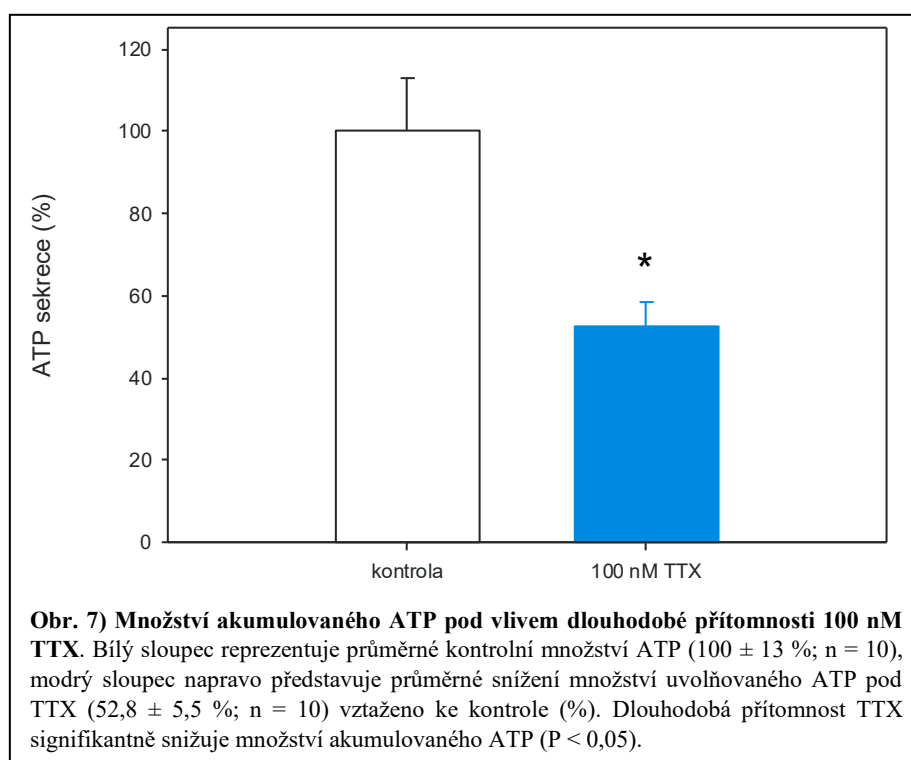


**Obr. 5) Množství akumulovaného ATP pod vlivem jednorázové aplikace 1 nM melatoninu v 16:00.** Bílý sloupec reprezentuje průměrné kontrolní množství ATP ( $100 \pm 19,3$  %;  $n = 5$ ), červený sloupec napravo představuje průměrné snížení množství uvolňovaného ATP pod melatoninem ( $83 \pm 5,6$  %;  $n = 5$ ) vztaženo ke kontrole (%). Jednorázová aplikace melatoninu neovlivňuje signifikantně množství uvolňovaného ATP ( $P > 0,05$ ).

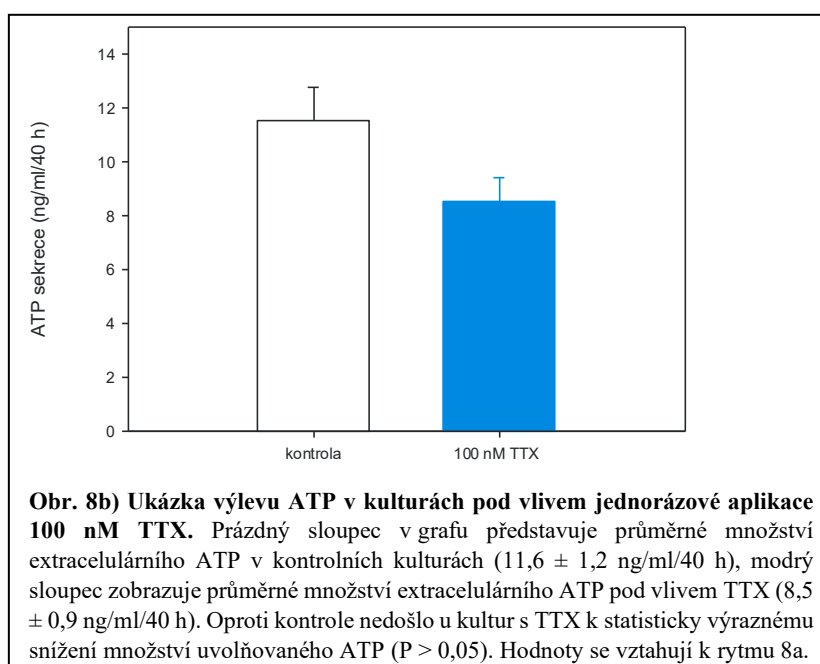
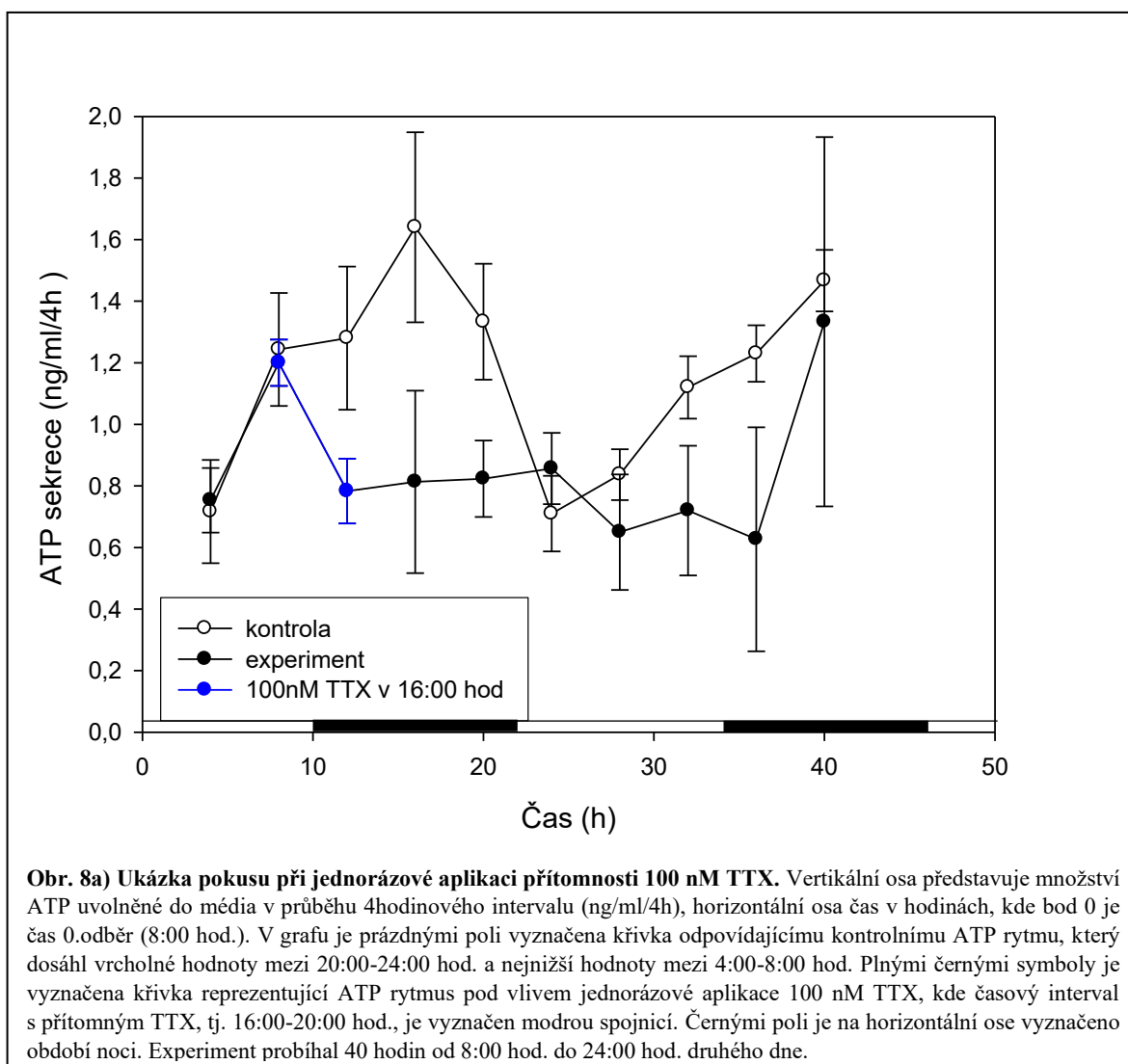
### 6.3. Vliv dlouhodobé přítomnosti TTX na rytmus ATP



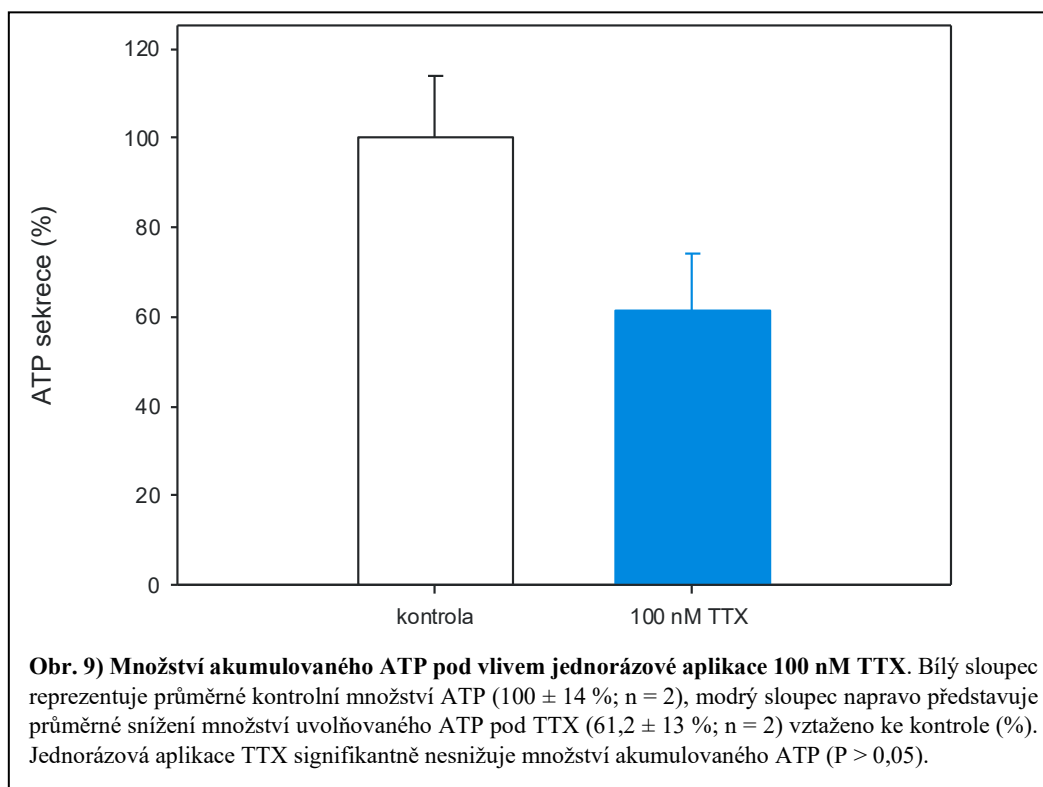
K zjištění, zda je do mechanismu regulujícího ATP rytmus zapojena i populace neuronů SCN, byl k organotypickým kulturám přidán TTX v koncentraci 100 nM, který byl v médiu přítomen po celou dobu experimentu. Kontrolní ATP rytmus vykazoval typický nárůst  $[ATP]_e$  kolem 24:00 hod. (CT 18) a minimální hladinu  $[ATP]_e$  mezi 4:00–8:00 hod. (CT 22–2) (Obr. 6a). Pod vlivem 100 nM TTX došlo u kultur ve všech pokusech ( $n = 10$ ) k výrazné desynchronizaci. Průběh ATP rytmu varioval napříč kulturami, v žádném případě si ovšem rytmus nezachoval svůj typický průběh včetně fáze, amplitudy a periody. Vedle toho byl rytmus ovlivněný přítomností TTX výrazně inhibován a množství extracelulárního ATP představovalo pouze  $52,8 \pm 5,6 \%$  ( $n = 10$ ;  $P < 0,05$ ) oproti kontrolním hodnotám (Obr. 7). Na rozdíl tedy od působení melatoninu došlo ve všech případech k narušení průběhu rytmu, bez jednotícího efektu posunutí fáze.



#### 6.4. Vliv jednorázové aplikace TTX v 16:00 hod. na rytmus extracelulárního ATP



Obdobně jako byl ke kulturám aplikován jednorázově melatonin, byl ve stejný čas, tj. 16:00 hod. (CT 10), aplikován i 100 nM TTX. Rytmus pod vlivem TTX byl oproti kontrole desynchronizován, nevykazoval typický cirkadiánní průběh změny  $[ATP]_e$  ve srovnání s kontrolou (Obr. 8a), stejně jako v případě dlouhodobé aplikace TTX. Vrcholné koncentrace bylo dosaženo mezi 12:00–16:00 hod. (CT 6–10) a následně po aplikaci TTX se výlev ATP značně snížil a následovala plató fáze bez výraznějších výkyvů až do opětovného zvýšení  $[ATP]_e$ , ke kterému došlo druhý den mezi 20:00–24:00 (CT 14–18) a probíhalo tak paralelně se zvýšeným výlevem ATP u kontrolního rytmu. Vedle desynchronizace došlo také pod vlivem jednorázové aplikace 100 nM TTX ke snížení celkové akumulace extracelulárního ATP ( $61,2 \pm 13 \%$ ;  $n = 2$ ) oproti kontrole ( $100 \pm 14 \%$ ;  $n = 2$ ). Výsledek ovšem nebyl signifikantní na rozdíl od dlouhodobé aplikace TTX, což ale může být i odrazem nízkého počtu provedených pokusů.



## 7. Diskuse

Organotypické kultury jsou ideální *in vitro* metodou, která se v rámci možností co nejlépe přibližuje k *in vivo* stavu, a to díky zachování fyziologické struktury tkáně. Rytmus ve výlevu ATP, ke kterému dochází *in vivo* v suprachiasmatickém jádru (Womac et al., 2009), lze proto měřit i *in vitro* v organotypických kulturách (Svobodova et al., 2018). ATP je do extracelulárního prostoru uvolňované astrocyty, v čase temnostní fáze cirkadiálního rytmu, tedy paralelně s cirkadiálním rytmem aktivity zmíněných glií, která je v antifázi s denní aktivitou neuronů (Hastings et al., 2019; McArthur et al., 1991). Výsledkem této noční aktivity astrocytů je tak periodicky se měnící  $[ATP]_e$  v SCN, v případě organotypických kultur pak v analyzovaném médiu. Tato přístupová metoda byla využita při studiu vlivu melatoninu na zmíněný ATP rytmus.

Melatonin interaguje s SCN prostřednictvím svých receptorů MT1 a MT2 a je tak schopen modulovat procesy v jádře jako rytmus elektrické aktivity neuronů (Hunt et al., 2001; McArthur et al., 1991) nebo rytmus akumulace AVP (Svobodova et al., 2003). Přestože tedy melatonin není zapotřebí k udržení rytmicity – SCN pracuje jako pacemaker autonomně – ovlivňuje fyziologii SCN. Toho se ostatně už delší dobu využívá v klinické praxi při korigování cirkadiálních dysbalancí. V souladu s tímto bylo zjištěno, že i ATP rytmus je melatoninem ovlivnitelný. Pod vlivem hormonu došlo ke snížení amplitudy a ke změně fáze ATP rytmu, nicméně perioda zůstala zachována. Při jednorázové aplikaci melatoninu v CT 10 došlo k fázovému zpoždění, ve směru posunu fáze o  $\sim 4$  hodiny u 64 % kultur ( $n = 22$ ). Oproti kontrole, kde rytmus ATP dosahoval nejvyšších hladin mezi CT 18–22, bylo vrcholné hladiny  $[ATP]_e$  dosaženo až kolem CT 2. Posunem opačným směrem (fázovým předběhnutím) pod vlivem aplikace melatoninu v CT 10 reaguje rytmus AVP, nicméně v jeho případě se jedná o rytmus peptidu uvolňovaného neurony s nejvyššími hladinami během dne a nejnižšími během noci (Svobodova et al., 2003). AVP rytmus se posouvá i při aplikaci melatoninu v CT 2, tedy v čase druhého známého citlivostního okna SCN pro melatonin, směr je však opačný oproti prvnímu oknu a dochází k fázovému zpoždění (Svobodova et al., 2003), tedy k obdobnému efektu jako v případě ATP rytmu v CT 10. V experimentu s ATP rytmem nebyla zkoumána změna fáze pod vlivem melatoninu jednorázově aplikovaným v CT 2, nicméně alespoň na základě reakce v CT 10 lze předpokládat, že rytmus ATP reaguje na melatonin posunem, který je opačný, než u rytmu AVP (Svobodova et al., 2003), rytmu elektrické aktivity neuronů (Gillette and McArthur, 1996) nebo rytmu lokomoční aktivity u lidí (Burke et al., 2013) a hlodavců (Benloucif and Dubocovich, 1996).

Stejně jako u jednorázové aplikace melatoninu i v jeho kontinuální přítomnosti došlo u rytmů k posunu, konkrétně u 38 % kultur ( $n = 24$ ). Melatonin byl v médiu přítomen po celou dobu experimentu počínaje 8:00 hod., kdy proběhl 0. odběr. Stejně jako u jednorázové aplikace byl vrchol rytmu posunut o  $\sim 4$  hodiny oproti kontrole a nejvyšší hladiny tak bylo dosaženo mezi CT 22–2 následujícího rána. U části kultur (25 %;  $n = 24$ ) došlo k vrcholu kolem CT 14, což by odpovídalo fázovému předběhnutí v důsledku působení melatoninu na přelomu noci a dne, i.e. CT 23 – CT 2 (Rivera-Bermúdez et al., 2003). Bylo by ovšem potřeba provést dlouhodobější měření k zaznamenání několika následujících cirkadiánních rytmů. U obou typů pokusů, tedy jak v kontinuální přítomnosti melatoninu, tak při jeho jednorázové aplikaci v CT 10, došlo v důsledku působení hormonu v čase citlivostního okna k posunu fáze rytmu se stejným vzorem, a to ke  $\sim 4$  zpoždění. Ovšem na rozdíl od kultur s jednorázovou aplikací melatoninu, došlo v nemalém podílu kultur s dlouhodobou přítomností melatoninu k atypickému průběhu v hladině  $[ATP]_e$ , což může odrážet nefyziologické podmínky takového stavu a také schopnost melatoninu působit na neurony po celý průběh cirkadiánního rytmu (Jiang et al., 1995; Scott et al., 2010; van den Top et al., 2001). Z výsledků popisující posuny fází plyne, zvláště vzhledem k dlouhodobé přítomnosti melatoninu v kulturách, že pro posun fáze rytmu je podstatné správné načasování, tj. přítomnost citlivostního okna, a faktoru indukujícího posun, tedy melatoninu, jinými slovy, v jinou dobu cirkadiánního rytmu i přes přítomnost melatoninu k posunu nedochází.

Dalším pozorovaným dopadem aplikace melatoninu byla snížená akumulace extracelulárního ATP v médiu. V kontinuální přítomnosti je inhibiční efekt melatoninu závislý na dávce, ovšem pouze do koncentrace 1 nM, další zvyšování koncentrace následně nemá na snižování výlevu ATP signifikantní vliv. Vzhledem k tomu, že k plné saturaci melatoninových receptorů postačuje koncentrace 1–10 nM (Cardinali, 2019), odpovídající disociační konstantě mezi 0,1–0,01 nM (Dubocovich and Takahashi, 1987; Ebisawa et al., 1994; Vaněček, 1988), lze odvodit, že pozorovaná plató fáze je výsledkem hraniční aktivace receptorů. To podporuje i fakt, že pokud by melatonin i přes nízkou koncentraci interagoval mimo receptory, pravděpodobně by byl efekt opačný a došlo by k posílení výlevu, soudě podle jinak benefičního vlivu melatoninu na tvorbu ATP v mitochondriích (Tan et al., 2016). Nicméně zapojení melatoninových receptorů do procesu bylo odvozeno pouze nepřímou na základě známých poznatků a pro potvrzení by bylo potřeba provést další experimenty cílící přímo na tyto struktury. Na rozdíl od dlouhodobé přítomnosti melatoninu nedošlo při jeho jednorázové aplikaci ke statisticky významnému snížení celkové akumulace extracelulárního ATP, nicméně došlo k akutní inhibici výlevu ATP v intervalu navazujícím na čas aplikace. Jaký je

mechanismus ležící za touto inhibicí diplomová práce neobjasňuje, mohlo by jednat o kaskádu odvozenou od aktivace  $G_i$  proteinu, který je s melatoninovými receptory spřažen (Jockers et al., 2016) a jehož aktivace je podmíněčná např. i pro melatoninem navozenou hyperpolarizaci (van den Top et al., 2001) nebo pro melatoninem navozenou inhibici výlevu AVP a LH (Vanecek and Watanabe, 1999). Další možností pro snížené množství ATP v médiu pod vlivem melatoninu je vysvětlení, že melatonin neovlivňuje proces uvolňování či syntézy ATP v buňkách, ale spíše podporuje jeho zvýšenou degradaci prostřednictvím ektonukleotidáz. Melatonin je prostřednictvím svých receptorů MT1 a MT2 schopen regulovat prostorové a časové zastoupení povrchově vázaných ektonukleotidáz (Homola et al., 2015), stejně tak jako zvyšovat expresi jejich mRNA (Homola et al., 2016). Pokud by se zvýšené množství mRNA ektonukleotidáz promítlo i do zvýšené hladiny samotných proteinů a jejich aktivity, následoval by nárůst koncentrace extracelulárního adenosinu a nutně i snížení [ATP]<sub>e</sub>. V práci nebyla řešena případná změna extracelulární koncentrace adenosinu na úkor množství extracelulárního ATP, a proto nemůže být vyloučena ani jedna možnost.

Přítomnost melatoninu má tak na ATP rytmus dva odlišné efekty, inhibici a posun. Snížené množství extracelulárního ATP je statisticky významné při dlouhodobé přítomnosti melatoninu, dochází k němu po celý průběh cirkadiálního cyklu a jeho velikost závisí na koncentraci aplikovaného melatoninu. Vedle toho je posun pozorován pouze v odpovědi na melatonin v CT 10 případně i v CT 2, ovšem opačným směrem. K objasnění nekoherentního působení melatoninu na rytmus ATP bude potřeba dalších studií, nicméně se nejedná o první případ, kdy faktor ovlivňující fyziologii SCN působí dvěma na sobě nezávislými efekty a dvěma odlišnými mechanismy. Např. světlo, zeitgeber, který je co do velikosti indukovaného efektu ekvivalentní melatoninu (Burke et al., 2013) působí jednak posunem fáze lokomoční aktivity a vedle toho i potlačením sekrece melatoninu (Rahman et al., 2018). A zatímco k potlačení sekrece melatoninu pod vlivem světla dochází po celý průběh noci, nezávisle na předchozím světelném stimulu, schopnost SCN posunout fázi rytmu mizí po prvním vystavení světlu. Vysvětlením dvou různých dopadů aplikace melatoninu by mohlo být odlišné zapojení jeho specifických receptorů v jednotlivých jevech, podobně jako bylo již prokázáno i v jiných procesech (Gobbi and Comai, 2019). Zatímco MT1 receptor je spojován s inhibicí elektrické aktivity neuronů (Liu et al., 1997), MT2 receptor je asociován s efektem posunu fáze rytmu (Dubocovich et al., 2005; Homola et al., 2016; Hunt et al., 2001). Melatonin působí na neurony inhibičně i v koncentračně závislém mechanismu (Oliveira-Abreu et al., 2018) a nezávisle na času aplikace (Scott et al., 2010; van den Top et al., 2001), což odpovídá i výsledkům přineseným v této diplomové práci. Co se týče posunu, z dřívějších studií vyplývá, že je



melatonin v koncentraci 1 nM schopen posunout transkripci genů *Per1* a *Per2* a to o 3,6 hod. (Kandalepas et al., 2016) a elektrickou aktivitu neuronů v závislosti na délce aplikace od 3,8 – 4,2 hod. (McArthur et al., 1997), což opět souhlasí i s výsledky přinesenými v této diplomové práci. Otázkou zůstává, proč k posunu došlo pouze v určitém podílu kultur (50 %; n = 46). Odpovědí by mohla být desensitizace melatoninových receptorů a s tím související škála zvolených koncentrací melatoninu (Gerdin et al., 2004) a délka aplikace (McArthur et al., 1997).

Extracelulární ATP v SCN je uvolňované astrocyty, buněčnou populací, která je nemalou vahou zastoupena v SCN a aktivně se podílí na cirkadiálním pacemakingu (Brancaccio et al., 2017, 2019). Nicméně přesto, že je ATP uvolňované astrocyty, nejedná se o proces, který by byl jimi autonomně zprostředkován. Při jednorázové i dlouhodobé aplikaci TTX, který inhibuje elektrickou aktivitu neuronů, došlo k desynchronizaci ATP rytmu a v případě dlouhodobé aplikace TTX i statisticky významnému snížení množství akumulovaného extracelulárního ATP, takové výsledky ukazují na zapojení neuronů do mechanismu řídicího výlev ATP. Srovnávat lze s rytmem glutamátu, který je obdobně jako ATP uvolňován astrocyty a stejně jako ATP rytmus dosahuje nejvyšších hladin během noci (Brancaccio et al., 2017). V případě glutamátu ovšem k narušení pod vlivem TTX nedochází (Brancaccio et al., 2017) a rytmus je tak výsledkem endogenní aktivity astrocytů. Tento astrocytární glutamát je součástí smyček schopných zasáhnout do TTFL neuronů, a tak při dysregulaci jeho rytmu dochází i k ovlivnění oscilací *Per2* neuronů (Brancaccio et al., 2019). Naopak, není známo, jestli něco obdobného platí i pro ATP rytmus, nicméně stejně jako zmíněný glutamát je i jeho význam dáván do souvislosti s inhibicí neuronové sítě SCN. V obou případech prostřednictvím presynaptického působení a potenciace GABAergní signalizace (Bhattacharya et al., 2013; Brancaccio et al., 2017), která během noci působí v SCN jako inhibiční neurotransmitter (Wagner et al., 1997). Paralelně přítomné rytmy ATP a glutamátu tak možná vedle sebe neexistují neprovázané. V hipokampu bylo ukázáno, že právě vzájemná spolupráce těchto dvou signálních molekul vede ke zvýšené excitaci neuronů (Shen et al., 2017), kdy astrocyty uvolňovaný glutamát působí na přilehlé neurony a aktivuje je, nicméně aby byla odpověď dostatečná, je zapotřebí současného autokrinního působení ATP aktivujícího astrocytární populaci. K obdobné interakci mezi astrocyty a neurony, kde spojnice je představovaná dvojicí ATP a glutamátu dochází i např. v paraventriculárním jádru hypotalamu (Ferreira-Neto et al., 2013). Ve světle těchto poznatků by se tedy v SCN mohlo jednat o takovou astrocyto-neuronovou spolupráci zahrnující ATP a glutamát, která by se podílela na změnách elektrické aktivity SCN napříč cirkadiálním rytmem.

Jak již bylo uvedeno výše, narušení neuronového přenosu je doprovázeno narušeným rytmem akumulace extracelulárního ATP. Vzhledem k tomu, že TTX blokuje tvorbu akčních potenciálů a prostřednictvím toho i synaptickou transmissi, podílí se SCN neurony zatím neznámým způsobem na mechanismu řídící ATP rytmus. Obdobně dochází pod vlivem TTX i k inhibici jiných rytmů jako např. behaviorálních rytmů, rytmu spotřeby glukózy v SCN a samozřejmě i rytmu elektrické aktivity SCN (Schwartz et al., 1987; Shibata and Moore, 1993; Welsh et al., 1995). Odmytím TTX se tyto rytmy obnovují s fází předchozích oscilací, což podporuje zjištění, že TTX nezastavuje molekulární mechanismus hodin, jako spíše blokuje projevy rytmicity, které se promítají i do cirkadiánně se měnící  $[ATP]_e$ . Také v pokusu s jednorázovou aplikací TTX došlo ke konci měření k nárustu  $[ATP]_e$  současně s kontrolním rytmem, což by mohlo reflektovat obnovení rytmického výstupu endogenního rytmu, pro potvrzení by bylo ovšem potřeba provést dlouhodobější měření. Kromě zjevého dopadu TTX na rytmus ATP byla pravděpodobnost zapojení vnějšího faktoru, stojícího mimo astrocyty samotné a podílející ho se na výlevu ATP naznačena už i v dřívější studii (Womac et al., 2009). Ta ukázala, že primární kultury kortikálních astrocytů sice vykazují rytmy v  $[ATP]_e$  s periodou  $23,1 \pm 0,2$  hodin, nicméně jsou kratší oproti obdobným rytmům v SCN2.2 kulturách<sup>4</sup>, kde je rytmus udržován s periodou 23,7 hodin. Není známo, jaká je podstata této neuron-astrocytární komunikace modulujícího ATP rytmus, pravděpodobně se ale jedná o parakrinně působící molekulu. Nejzastoupenějším neurotransmiterem v SCN je GABA (Strecker et al., 1997) a melatonin sám je schopen zvýšit GABAergní tonus neuronové sítě v SCN (Scott et al., 2010) i jinde (Cheng et al., 2012). GABA je schopna posunout fázi rytmu (Albers et al., 2017), spolu s ní ovšem i hojně diskutovaný VIP (Hamnett et al., 2019; Jones et al., 2018) nebo GRP (Aida et al., 2002) a mnoho dalších. Vedle toho nemůže být vyloučena ani možnost, že melatonin působí vedle neuronů i na astrocyty a ATP rytmus je tak vlivem melatoninu regulován jak ze strany neuronů, tak ze strany gliových buněk, kde by melatonin mohl působil přímo snížením množství uvolňovaného ATP, obdobně jako snižuje výlev i jiných molekul z buněk (Peschke, 2008; Vanecek and Watanabe, 1999). O případném vlivu melatoninu na astrocyty SCN není známo nic, přesto melatonin působí na astrocyty v různých oblastech mozku a to i prostřednictvím svých receptorů (Adachi et al., 2002; Kong et al., 2008; Peters et al., 2005). U astrocytů SCN ovšem není jistá ani přítomnost melatoninových receptorů, přestože na gliových buňkách SCN2.2 přítomny jsou (Gerdin et al., 2004).

---

<sup>4</sup> Kultura immortalizovaných SCN buněk potkana

Z výsledků práce tedy vyplývá, že melatonin je schopen ovlivnit ATP rytmus jednak množstvím uvolňovaného ATP, a za druhé také posunem fáze rytmu. Snížení akumulace ATP je úměrné aplikované dávce melatoninu do hodnoty plně saturující melatoninové receptory. Posun fáze rytmu nastává na přelomu dne a noci, tak jak bylo prokázáno i u jiných fyziologických procesů SCN ovšem opačným směrem, tedy ATP rytmus se pod vlivem melatoninu v tomto časovém úseku zpožďuje na rozdíl od rytmu aktivity neuronů, u které dochází k předběhnutí. Oba efekty jsou zprostředkované působením melatoninu na své receptory a jedná se tedy o specifický zásah melatoninu do procesu řídicího fyziologii SCN.

## 8. Závěr

Cirkadiánní rytmy a následky jejich narušení jsou aktuálním tématem nejvyššího zájmu biologie a medicíny. Je ukázáno, že zásah do této periodičnosti je doprovázen plejádou onemocnění od deprese, rakoviny až po metabolické choroby. Poznání fyziologie SCN, jakožto řídicího centra biologických hodin, je tedy základním předpokladem pro dokonalé poznání patofyziologie cirkadiánních rytmů, od kterého dále může pokračovat vývoj směrem ke klinickému využití na poli léčby nejen výše zmíněných chorob. ATP rytmus je jeden z fyziologických projevů činnosti SCN, proto i jeho další poznání je žádoucí, ne-li nutné, k dosažení tohoto cíle. Cílem práce bylo popsat efekt s jakým působí aplikovaný melatonin na projev ATP rytmu v SCN. Bylo ukázáno, že obdobně jako melatonin posouvá fázi cirkadiánního průběhu u jiných rytmů, působí tak i na úrovni akumulace extracelulárního množství ATP, kdy na přelomu dne a noci způsobuje fázové zpoždění. Dále bylo změřeno, že melatonin snižuje celkový výlev ATP do média, a to s přímou úměrou na délce svého působení a koncentraci, ve které je aplikován. Oba tyto efekty jsou pravděpodobně dány působením melatoninu na své specifické receptory. Vedle toho bylo na základě desynchronizačního dopadu TTX ukázáno, že ATP rytmus je výsledkem interakce mezi buněčnými populacemi astrocytů a neuronů. Takovýto výsledek posiluje představu o nezastupitelné roli tohoto druhu kooperace v procesu pacemakingu SCN, o kterém se ovšem zatím ví jen velmi málo a je zde tak veliký potenciál pro budoucí směřování výzkumu.

## 9. Literatura

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhatsky, A., and Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32, 19–29.
- Abitbol, K., Debieesse, S., Molino, F., Mesirca, P., Bidaud, I., Minami, Y., Mangoni, M.E., Yagita, K., Mollard, P., and Bonnefont, X. (2017). Clock-dependent and system-driven oscillators interact in the suprachiasmatic nuclei to pace mammalian circadian rhythms. *PloS One* 12, e0187001.
- Adachi, A., Natesan, A.K., Whitfield-Rucker, M.G., Weigum, S.E., and Cassone, V.M. (2002). Functional melatonin receptors and metabolic coupling in cultured chick astrocytes. *Glia* 39, 268–278.
- Agez, L., Laurent, V., Pévet, P., Masson-Pévet, M., and Gauer, F. (2007). Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 144, 522–530.
- Aida, R., Moriya, T., Araki, M., Akiyama, M., Wada, K., Wada, E., and Shibata, S. (2002). Gastrin-releasing peptide mediates photic entrainable signals to dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of Period gene in mice. *Mol. Pharmacol.* 61, 26–34.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Shibata, S. (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 1115–1121.
- Albers, H.E., Walton, J.C., Gamble, K.L., McNeill, J.K., and Hummer, D.L. (2017). The dynamics of GABA signaling: Revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Front. Neuroendocrinol.* 44, 35–82.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., and Meijer, J.H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol. CB* 15, 886–893.
- Allen, N.J. (2013). Role of glia in developmental synapse formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1027–1033.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.
- Baba, K., Benleulmi-Chaachoua, A., Journé, A.-S., Kamal, M., Guillaume, J.-L., Dussaud, S., Gbahou, F., Yettou, K., Liu, C., Contreras-Alcantara, S., et al. (2013). Heteromeric MT1/MT2 melatonin receptors modulate photoreceptor function. *Sci. Signal.* 6, ra89.
- Babae, A., Eftekhari-Vaghefi, S.H., Asadi-Shekaari, M., Shahrokhi, N., Soltani, S.D., Malekpour-Afshar, R., and Basiri, M. (2015). Melatonin treatment reduces astrogliosis and apoptosis in rats with traumatic brain injury. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 18, 867–872.
- Baptiste, L., Debra, A., Sergio, D.-L., Sara, C., Alessandro, M., Franco, F., Laurent, D., and Gabriella, G. (2015). Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. *J. Pineal Res.* 397.

- Barca-Mayo, O., Pons-Espinal, M., Follert, P., Armirotti, A., Berdondini, L., and De Pietri Tonelli, D. (2017). Astrocyte deletion of *Bmal1* alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling. *Nat. Commun.* 8, 14336.
- Basheer, R., Strecker, R.E., Thakkar, M.M., and McCarley, R.W. (2004). Adenosine and sleep-wake regulation. *Prog. Neurobiol.* 73, 379–396.
- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., François-Bellan, A.-M., and Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56, 294–305.
- Bell, P.D., Lapointe, J.-Y., Sabirov, R., Hayashi, S., Peti-Peterdi, J., Manabe, K.-I., Kovacs, G., and Okada, Y. (2003). Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4322–4327.
- Benloucif, S., and Dubocovich, M.L. (1996). Melatonin and light induce phase shifts of circadian activity rhythms in the C3H/HeN mouse. *J. Biol. Rhythms* 11, 113–125.
- Bhattacharya, A., Vavra, V., Svobodova, I., Bendova, Z., Vereb, G., and Zemkova, H. (2013). Potentiation of Inhibitory Synaptic Transmission by Extracellular ATP in Rat Suprachiasmatic Nuclei. *J. Neurosci.* 33, 8035–+.
- Borlongan, C.V., Yamamoto, M., Takei, N., Kumazaki, M., Ungsuparkorn, C., Hida, H., Sanberg, P.R., and Nishino, H. (2000). Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 1307–1317.
- Brancaccio, M., Maywood, E.S., Chesham, J.E., Loudon, A.S.I., and Hastings, M.H. (2013). A Gq-Ca<sup>2+</sup> axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. *Neuron* 78, 714–728.
- Brancaccio, M., Enoki, R., Mazuski, C.N., Jones, J., Evans, J.A., and Azzi, A. (2014). Network-mediated encoding of circadian time: the suprachiasmatic nucleus (SCN) from genes to neurons to circuits, and back. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 15192–15199.
- Brancaccio, M., Patton, A.P., Chesham, J.E., Maywood, E.S., and Hastings, M.H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93, 1420-1435.e5.
- Brancaccio, M., Edwards, M.D., Patton, A.P., Smyllie, N.J., Chesham, J.E., Maywood, E.S., and Hastings, M.H. (2019). Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science* 363, 187–192.
- Burke, T.M., Markwald, R.R., Chinoy, E.D., Snider, J.A., Bessman, S.C., Jung, C.M., and Wright, K.P. (2013). Combination of light and melatonin time cues for phase advancing the human circadian clock. *Sleep* 36, 1617–1624.
- Burke, J.F., Womac, A.D., Earnest, D.J., and Zoran, M.J. (2011). Mitochondrial Calcium Signaling Mediates Rhythmic Extracellular ATP Accumulation in Suprachiasmatic Nucleus Astrocytes. *J. Neurosci.* 31, 8432–8440.

- Burnstock, G. (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp. Physiol.* *99*, 16–34.
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* *2*, 2398212818817494.
- Cardinali, D.P. (2019). Melatonin: Clinical Perspectives in Neurodegeneration. *Front. Endocrinol.* *10*.
- Chagoya de Sánchez, V. (1995). Circadian variations of adenosine and of its metabolism. Could adenosine be a molecular oscillator for circadian rhythms? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *73*, 339–355.
- Cheng, X.-P., Sun, H., Ye, Z.-Y., and Zhou, J.-N. (2012). Melatonin modulates the GABAergic response in cultured rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Sci.* *119*, 177–185.
- Chern, C.-M., Liao, J.-F., Wang, Y.-H., and Shen, Y.-C. (2012). Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radic. Biol. Med.* *52*, 1634–1647.
- Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M., and Verderio, C. (2003). Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* *278*, 1354–1362.
- Colwell, C.S. (2011). Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 553–569.
- Dardente, H., Menet, J.S., Poirel, V.J., Streicher, D., Gauer, F., Vivien-Roels, B., Klosien, P., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2003). Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *114*, 101–106.
- Das, A., Belagodu, A., Reiter, R.J., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2008). Cytoprotective effects of melatonin on C6 astroglial cells exposed to glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *J. Pineal Res.* *45*, 117–124.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* *8*, 752–758.
- Del Puerto, A., Fronzaroli-Molinieres, L., Perez-Alvarez, M.J., Giraud, P., Carlier, E., Wandosell, F., Debanne, D., and Garrido, J.J. (2015). ATP-P2X7 Receptor Modulates Axon Initial Segment Composition and Function in Physiological Conditions and Brain Injury. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *25*, 2282–2294.
- Dubocovich, M.L., and Takahashi, J.S. (1987). Use of 2-[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 3916–3920.
- Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benloucif, S., and Masana, M.I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *12*, 1211–1220.

- Dubocovich, M.L., Hudson, R.L., Sumaya, I.C., Masana, M.I., and Manna, E. (2005). Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. *J. Pineal Res.* 39, 113–120.
- Duhart, J.M., Leone, M.J., Paladino, N., Evans, J.A., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A.J., and Golombek, D.A. (2013). Suprachiasmatic astrocytes modulate the circadian clock in response to TNF- $\alpha$ . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 4656–4664.
- Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R., and Reppert, S.M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6133–6137.
- Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* 93, 107–135.
- Ferreira-Neto, H.C., Yao, S.T., and Antunes, V.R. (2013). Purinergic and glutamatergic interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow. *Purinergic Signal.* 9, 337–349.
- Galano, A., Tan, D.X., and Reiter, R.J. (2013). On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res.* 54, 245–257.
- Gau, D., Lemberger, T., von Gall, C., Kretz, O., Le Minh, N., Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H.W., and Schütz, G. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34, 245–253.
- Gerdin, M.J., Masana, M.I., Rivera-Bermúdez, M.A., Hudson, R.L., Earnest, D.J., Gillette, M.U., and Dubocovich, M.L. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1646–1656.
- Gillette, M.U., and McArthur, A.J. (1996). Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Brain Res.* 73, 135–139.
- Gobbi, G., and Comai, S. (2019). Differential Function of Melatonin MT1 and MT2 Receptors in REM and NREM Sleep. *Front. Endocrinol.* 10, 87.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M.V., Charles, A.C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 520–528.
- Hallworth, R., Cato, M., Colbert, C., and Rea, M.A. (2002). Presynaptic Adenosine A1 Receptors Regulate Retinohypothalamic Neurotransmission in the Hamster Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurobiol.* 52, 230–240.
- Hamnett, R., Crosby, P., Chesham, J.E., and Hastings, M.H. (2019). Vasoactive intestinal peptide controls the suprachiasmatic circadian clock network via ERK1/2 and DUSP4 signalling. *Nat. Commun.* 10, 542.



- Harada, K., Kamiya, T., and Tsuboi, T. (2015). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Front. Neurosci.* 9, 499.
- Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.-C., et al. (2002). Article: The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei. *Cell* 109, 497–508.
- Hashem, H. (2018). The possible protective role of melatonin on the changes in the cerebral cortex and meninges of streptozotocin-induced diabetes in adult male albino rats (histological and immunohistochemical study). *Egypt. J. Histol.* 41, 533–545.
- Hastings, M.H., Brancaccio, M., and Maywood, E.S. (2014). Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 26, 2–10.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., and Brancaccio, M. (2019). The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. *Biology* 8, 13.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., and Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- Heinrich, A., Andó, R.D., Túri, G., Rózsa, B., and Sperlág, B. (2012). K<sup>+</sup> depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br. J. Pharmacol.* 167, 1003–1020.
- Homola, M., Pfeffer, M., Fischer, C., Zimmermann, H., Robson, S., and Korf, H.-W. (2015). Expression of ectonucleotidases in the prosencephalon of melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57Bl mice: spatial distribution and time-dependent changes. *Cell Tissue Res.* 362.
- Homola, M., Pfeffer, M., Robson, S.C., Fischer, C., Zimmermann, H., and Korf, H.-W. (2016). Melatonin receptor deficiency decreases and temporally shifts ecto-5'-nucleotidase mRNA levels in mouse prosencephalon. *Cell Tissue Res.* 365, 147–156.
- Houdek, P., Nováková, M., Polidarová, L., Sládek, M., and Sumová, A. (2016). Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Horm. Behav.* 83, 1–5.
- Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6436–6441.
- Humpel, C. (2015). Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* 305, 86–98.
- Hunt, A.E., Al-Ghoul, W.M., Gillette, M.U., and Dubocovich, M.L. (2001). Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C110–118.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte “hemichannels.” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 7092–7097.

Jakubcakova, V., Oster, H., Tamanini, F., Cadenas, C., Leitges, M., van der Horst, G.T.J., and Eichele, G. (2007). Light entrainment of the mammalian circadian clock by a PRKCA-dependent posttranslational mechanism. *Neuron* 54, 831–843.

Jiang, Z.G., Nelson, C.S., and Allen, C.N. (1995). Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* 687, 125–132.

Jockers, R., Delagrange, P., Dubocovich, M.L., Markus, R.P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., and Zlotos, D.P. (2016). Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2702–2725.

Jones, J.R., Simon, T., Lones, L., and Herzog, E.D. (2018). SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 38, 7986–7995.

Jou, M.-J. (2011). Melatonin preserves the transient mitochondrial permeability transition for protection during mitochondrial Ca(2+) stress in astrocyte. *J. Pineal Res.* 50, 427–435.

Kafka, M.S., Marangos, P.J., and Moore, R.Y. (1985). Suprachiasmatic nucleus ablation abolishes circadian rhythms in rat brain neurotransmitter receptors. *Brain Res.* 327, 344–347.

Kandalepas, P.C., Mitchell, J.W., and Gillette, M.U. (2016). Melatonin Signal Transduction Pathways Require E-Box-Mediated Transcription of Per1 and Per2 to Reset the SCN Clock at Dusk. *PloS One* 11, e0157824.

Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4702–4711.

Kanno, T., and Nishizaki, T. (2011). CFTR mediates noradrenaline-induced ATP efflux from DRG neurons. *Mol. Pain* 7, 72.

Kleszczyński, K., Zillikens, D., and Fischer, T.W. (2016). Melatonin enhances mitochondrial ATP synthesis, reduces reactive oxygen species formation, and mediates translocation of the nuclear erythroid 2-related factor 2 resulting in activation of phase-2 antioxidant enzymes ( $\gamma$ -GCS, HO-1, NQO1) in ultraviolet radiation-treated normal human epidermal keratinocytes (NHEK). *J. Pineal Res.* 61, 187–197.

Kong, P.-J., Byun, J.-S., Lim, S.-Y., Lee, J.-J., Hong, S.-J., Kwon, K.-J., and Kim, S.-S. (2008). Melatonin Induces Akt Phosphorylation through Melatonin Receptor- and PI3K-Dependent Pathways in Primary Astrocytes. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* 12, 37–41.

Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G., and Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol.* 12, e1001747.

Lavialle, M., and Servière, J. (1993). Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 4, 1243–1246.

Lee, I.T., Chang, A.S., Manandhar, M., Shan, Y., Fan, J., Izumo, M., Ikeda, Y., Motoike, T., Dixon, S., Seinfeld, J.E., et al. (2015). Neuromedin S-Producing Neurons Act as Essential

Pacemakers in the Suprachiasmatic Nucleus to Couple Clock Neurons and Dictate Circadian Rhythms. *Neuron* 85, 1086–1102.

Leone, M.J., Beaule, C., Marpegan, L., Simon, T., Herzog, E.D., and Golombek, D.A. (2015). Glial and light-dependent glutamate metabolism in the suprachiasmatic nuclei. *Chronobiol. Int.* 32, 573–578.

Lewy, A.J., Emens, J.S., Lefler, B.J., Yuhas, K., and Jackman, A.R. (2005). Melatonin entrains free-running blind people according to a physiological dose-response curve. *Chronobiol. Int.* 22, 1093–1106.

Leybaert, L., and Sanderson, M.J. (2012). Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiol. Rev.* 92, 1359–1392.

Li, J.-D., Burton, K.J., Zhang, C., Hu, S.-B., and Zhou, Q.-Y. (2009). Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R824–830.

Li, S., Bjelobaba, I., Yan, Z., Kucka, M., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2011). Expression and roles of pannexins in ATP release in the pituitary gland. *Endocrinology* 152, 2342–2352.

Lin, J.H.-C., Takano, T., Arcuino, G., Wang, X., Hu, F., Darzynkiewicz, Z., Nunes, M., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2007). Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev. Biol.* 302, 356–366.

Lindberg, D., Andres-Beck, L., Jia, Y.-F., Kang, S., and Choi, D.-S. (2018). Purinergic Signaling in Neuron-Astrocyte Interactions, Circadian Rhythms, and Alcohol Use Disorder. *Front. Physiol.* 9, 9.

Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., and Reppert, S.M. (1997). Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91–102.

Liu, J., Clough, S.J., Hutchinson, A.J., Adamah-Biassi, E.B., Popovska-Gorevski, M., and Dubocovich, M.L. (2016). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 361–383.

Liu, T., Sun, L., Xiong, Y., Shang, S., Guo, N., Teng, S., Wang, Y., Liu, B., Wang, C., Wang, L., et al. (2011). Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10593–10601.

Liu, Y.-J., Zhuang, J., Zhu, H.-Y., Shen, Y.-X., Tan, Z.-L., and Zhou, J.-N. (2007). Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. *J. Pineal Res.* 43, 232–238.

Lommen, J., Stahr, A., Ingenwerth, M., Ali, A.A.H., and von Gall, C. (2017). Time-of-day-dependent expression of purinergic receptors in mouse suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.*

- López, L.C., Escames, G., Ortiz, F., Ros, E., and Acuña-Castroviejo, D. (2006). Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27, 623–630.
- Marpegan, L., Krall, T.J., and Herzog, E.D. (2009). Vasoactive intestinal polypeptide entrains circadian rhythms in astrocytes. *J. Biol. Rhythms* 24, 135–143.
- Marpegan, L., Swannstrom, A.E., Chung, K., Simon, T., Haydon, P.G., Khan, S.K., Liu, A.C., Herzog, E.D., and Beaule, C. (2011). Circadian Regulation of ATP Release in Astrocytes. *J. Neurosci.* 31, 8342–8350.
- Martín, M., Macías, M., León, J., Escames, G., Khaldy, H., and Acuña-Castroviejo, D. (2002a). Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 348–357.
- Martín, V., Sainz, R.M., Antolín, I., Mayo, J.C., Herrera, F., and Rodríguez, C. (2002b). Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin. *J. Pineal Res.* 33, 204–212.
- Mazzocchi, G., Pazienza, V., and Vinciguerra, M. (2012). Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiol. Int.* 29, 227–251.
- McArthur, A.J., Gillette, M.U., and Prosser, R.A. (1991). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 565, 158–161.
- McArthur, A.J., Hunt, A.E., and Gillette, M.U. (1997). Melatonin Action and Signal Transduction in the Rat Suprachiasmatic Circadian Clock: Activation of Protein Kinase C at Dusk and Dawn. *Endocrinology* 138, 627–634.
- Mieda, M., Ono, D., Hasegawa, E., Okamoto, H., Honma, K., Honma, S., and Sakurai, T. (2015). Cellular Clocks in AVP Neurons of the SCN Are Critical for Interneuronal Coupling Regulating Circadian Behavior Rhythm. *Neuron* 85, 1103–1116.
- Mieda, M., Okamoto, H., and Sakurai, T. (2016). Manipulating the Cellular Circadian Period of Arginine Vasopressin Neurons Alters the Behavioral Circadian Period. *Curr. Biol. CB* 26, 2535–2542.
- Moldavan, M., Cravetchi, O., Williams, M., Irwin, R.P., Aicher, S.A., and Allen, C.N. (2015). Localization and expression of GABA transporters in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 42, 3018–3032.
- Moore, R.Y. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu. Rev. Med.* 48, 253–266.
- Morin, L.P., Johnson, R.F., and Moore, R.Y. (1989). Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats. *Neurosci. Lett.* 99, 55–60.
- Nakazato, R., Takarada, T., Yamamoto, T., Hotta, S., Hinoi, E., and Yoneda, Y. (2011). Selective upregulation of Per1 mRNA expression by ATP through activation of P2X7 purinergic receptors expressed in microglial cells. *J. Pharmacol. Sci.* 116, 350–361.

- Neary, J.T., Rathbone, M.P., Cattabeni, F., Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1996). Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.* *19*, 13–18.
- Newman, E.A. (2001). Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 2215–2223.
- Okada, S.F., O’Neal, W.K., Huang, P., Nicholas, R.A., Ostrowski, L.E., Craigen, W.J., Lazarowski, E.R., and Boucher, R.C. (2004). Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. *J. Gen. Physiol.* *124*, 513–526.
- Oliveira-Abreu, K., Ferreira-da-Silva, F.W., Silva-Alves, K.S. da, Silva-Dos-Santos, N.M., Cardoso-Teixeira, A.C., Amaral, F.G. do, Cipolla-Neto, J., and Leal-Cardoso, J.H. (2018). Melatonin decreases neuronal excitability in a sub-population of dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* *1692*, 1–8.
- O’Neill, J.S., and Reddy, A.B. (2012). The essential role of cAMP/Ca<sup>2+</sup> signalling in mammalian circadian timekeeping. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 44–50.
- Ono, D., Honma, K., Yanagawa, Y., Yamanaka, A., and Honma, S. (2018). Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. *J. Physiol. Sci.* *68*.
- van Oosterhout, F., Lucassen, E.A., Houben, T., vanderLeest, H.T., Antle, M.C., and Meijer, J.H. (2012). Amplitude of the SCN clock enhanced by the behavioral activity rhythm. *PLoS One* *7*, e39693.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* *310*, 113–116.
- Paulose, J.K., Peters, J.L., Karaganis, S.P., and Cassone, V.M. (2009). Pineal melatonin acts as a circadian zeitgeber and growth factor in chick astrocytes. *J. Pineal Res.* *46*, 286–294.
- Peschke, E. (2008). Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J. Pineal Res.* *44*, 26–40.
- Peters, J.L., Earnest, B.J., Tjalkens, R.B., Cassone, V.M., and Zoran, M.J. (2005). Modulation of intercellular calcium signaling by melatonin in avian and mammalian astrocytes is brain region-specific. *J. Comp. Neurol.* *493*, 370–380.
- Pevet, P., and Challet, E. (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J. Physiol. Paris* *105*, 170–182.
- Pfeffer, M., Rauch, A., Korf, H.-W., and von Gall, C. (2012). The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT<sub>2</sub> receptors. *Chronobiol. Int.* *29*, 415–429.
- Pfeffer, M., Korf, H.-W., and Wicht, H. (2017). The Role of the Melatonergic System in Light-Entrained Behavior of Mice. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.

- Poirel, V.-J., Masson-Pévet, M., Pévét, P., and Gauer, F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 946, 64–71.
- Poirel, V.J., Boggio, V., Dardente, H., Pévet, P., Masson-Pévet, M., and Gauer, F. (2003). Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 120, 745–755.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W., and McCarley, R.W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276, 1265–1268.
- Prolo, L.M., Takahashi, J.S., and Herzog, E.D. (2005). Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 404–408.
- Quay, W.B. (1968). Individuation and lack of pineal effect in the rat's circadian locomotor rhythm. *Physiol. Behav.* 3, 109–118.
- Quintela, T., Gonçalves, I., Silva, M., Duarte, A.C., Guedes, P., Andrade, K., Freitas, F., Talhada, D., Albuquerque, T., Tavares, S., et al. (2018). Choroid plexus is an additional source of melatonin in the brain. *J. Pineal Res.* 65, e12528.
- Rahman, S.A., St Hilaire, M.A., Gronfier, C., Chang, A.-M., Santhi, N., Czeisler, C.A., Klerman, E.B., and Lockley, S.W. (2018). Functional decoupling of melatonin suppression and circadian phase resetting in humans. *J. Physiol.* 596, 2147–2157.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Rivera-Bermúdez, M.A., Gerdin, M.J., Earnest, D.J., and Dubocovich, M.L. (2003). Regulation of basal rhythmicity in protein kinase C activity by melatonin in immortalized rat suprachiasmatic nucleus cells. *Neurosci. Lett.* 346, 37–40.
- Rossignol, D.A., and Frye, R.E. (2014). Melatonin in autism spectrum disorders. *Curr. Clin. Pharmacol.* 9, 326–334.
- Ruby, C.L., Vadnie, C.A., Hinton, D.J., Abulseoud, O.A., Walker, D.L., O'Connor, K.M., Noterman, M.F., and Choi, D.-S. (2014). Adenosinergic regulation of striatal clock gene expression and ethanol intake during constant light. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 39, 2432–2440.
- Ryu, J.K., Choi, H.B., Hatori, K., Heisel, R.L., Pelech, S.L., McLarnon, J.G., and Kim, S.U. (2003). Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase. *J. Neurosci. Res.* 72, 352–362.
- S Maywood, E., E Chesham, J., O'Brien, J., and H Hastings, M. (2011). A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14306–14311.

- Schousboe, A., Bak, L.K., and Waagepetersen, H.S. (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front. Endocrinol.* 4, 102.
- Schwartz, W.J., Gross, R.A., and Morton, M.T. (1987). The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 1694–1698.
- Scott, F.F., Belle, M.D.C., Delagrange, P., and Piggins, H.D. (2010). Electrophysiological effects of melatonin on mouse *Per1* and non-*Per1* suprachiasmatic nuclei neurones in vitro. *J. Neuroendocrinol.* 22, 1148–1156.
- Shen, W., Nikolic, L., Meunier, C., Pfrieder, F., and Audinat, E. (2017). An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation. *Sci. Rep.* 7, 11280.
- Shibata, S., and Moore, R.Y. (1993). Tetrodotoxin does not affect circadian rhythms in neuronal activity and metabolism in rodent suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 606, 259–266.
- Sigworth, L.A., and Rea, M.A. (2003). Adenosine A1 receptors regulate the response of the mouse circadian clock to light. *Brain Res.* 960, 246–251.
- Silver, R. (2018). *Suprachiasmatic Nucleus Anatomy, Physiology, and Neurochemistry*. Oxf. Res. Encycl. Neurosci.
- Singh, M., and Jadhav, H.R. (2014). Review: Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov. Today* 19, 1410–1418.
- Souza-Teodoro, L.H., Dargenio-Garcia, L., Petrilli-Lapa, C.L., Souza, E. da S., Fernandes, P.A.C.M., Markus, R.P., and Ferreira, Z.S. (2016). Adenosine triphosphate inhibits melatonin synthesis in the rat pineal gland. *J. Pineal Res.* 60, 242–249.
- Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M.C., Lascorz, J., Depner, M., Holzberg, D., Soyka, M., et al. (2005). The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nat. Med.* 11, 35–42.
- Sperlágh, B., and Illes, P. (2014). P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 537–547.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C.G., and Charles, A.C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J. Biol. Chem.* 277, 10482–10488.
- Strecker, G.J., Wuarin, J.-P., and Dudek, F.E. (1997). GABAA-Mediated Local Synaptic Pathways Connect Neurons in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurophysiol.* 78, 2217–2220.
- Suh, J., and Jackson, F.R. (2007). *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron* 55, 435–447.

Svobodova, I., Vanecek, J., and Zemkova, H. (2003). The bidirectional phase-shifting effects of melatonin on the arginine vasopressin secretion rhythm in rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *116*, 80–85.

Svobodova, I., Bhattacharya, A., Ivetic, M., Bendova, Z., and Zemkova, H. (2018). Circadian ATP Release in Organotypic Cultures of the Rat Suprachiasmatic Nucleus Is Dependent on P2X7 and P2Y Receptors. *Front. Pharmacol.* *9*, 192.

Tan, D.-X., Manchester, L.C., Fuentes-Broto, L., Paredes, S.D., and Reiter, R.J. (2011). Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *12*, 167–188.

Tan, D.-X., Manchester, L.C., Qin, L., and Reiter, R.J. (2016). Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and Dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

Teng, Y.C., Tai, Y.I., Huang, H.J., and Lin, A.M.Y. (2015). Melatonin Ameliorates Arsenite-Induced Neurotoxicity: Involvement of Autophagy and Mitochondria. *Mol. Neurobiol.* *52*, 1015–1022.

Tominaga, K., Okamura, H., and Inouye, S.-I.T. (1994). Organotypic slice culture of the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *18*, 601–604.

van den Top, M., Buijs, R.M., Ruijter, J.M., Delagrange, P., Spanswick, D., and Hermes, M.L. (2001). Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience* *107*, 99–108.

Tosini, G., and Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* *272*, 419–421.

Tso, C.F., Simon, T., Greenlaw, A.C., Puri, T., Mieda, M., and Herzog, E.D. (2017). Astrocytes Regulate Daily Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus and Behavior. *Curr. Biol. CB* *27*, 1055–1061.

Vaněček, J. (1988). Melatonin binding sites. *J. Neurochem.* *51*, 1436–1440.

Vanecek, J., and Watanabe, K. (1999). Mechanisms of melatonin action in the pituitary and SCN. *Adv. Exp. Med. Biol.* *460*, 191–198.

Villela, D., Atherino, V.F., Lima, L. de S., Moutinho, A.A., do Amaral, F.G., Peres, R., Martins de Lima, T., Torráo, A. da S., Cipolla-Neto, J., Scavone, C., et al. (2013). Modulation of pineal melatonin synthesis by glutamate involves paracrine interactions between pinealocytes and astrocytes through NF- $\kappa$ B activation. *BioMed Res. Int.* *2013*, 618432.

Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., and Yarom, Y. (1997). GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* *387*, 598–603.

Wakamatsu, H., Takahashi, S., Moriya, T., Inouye, S.T., Okamura, H., Akiyama, M., and Shibata, S. (2001). Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport* *12*, 127–131.



Waly, N. e. ( 1 ), and Hallworth, R.( 2 ) (2015). Circadian pattern of melatonin MT1 and MT2 receptor localization in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Circadian Rhythms* 13, 1–7.

Wang, X., Sirianni, A., Pei, Z., Cormier, K., Smith, K., Jiang, J., Zhou, S., Wang, H., Zhao, R., Yano, H., et al. (2011). The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 14496–14507.

Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697–706.

Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577.

Wiederkehr, A., Szanda, G., Akhmedov, D., Matak, C., Heizmann, C.W., Schoonjans, K., Pozzan, T., Spät, A., and Wollheim, C.B. (2011). Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab.* 13, 601–611.

Womac, A.D., Burken, J.F., Neuendorff, N., Earnest, D.J., and Zoran, M.J. (2009). Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 30, 869–876.

Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2003). Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus. *Science* 302, 1408–1412.

Yamazaki, S., Ishida, Y., and Inouye, S. (1994). Circadian rhythms of adenosine triphosphate contents in the suprachiasmatic nucleus, anterior hypothalamic area and caudate putamen of the rat--negative correlation with electrical activity. *Brain Res.* 664, 237–240.

Yang, C., Larin, A., McKenna, J.T., Jacobson, K.A., Winston, S., Strecker, R.E., Kalinchuk, A., Basheer, R., and Brown, R.E. (2018). Activation of basal forebrain purinergic P2 receptors promotes wakefulness in mice. *Sci. Rep.* 8, 10730.

Yang, Y., Duan, W., Jin, Z., Yi, W., Yan, J., Zhang, S., Wang, N., Liang, Z., Li, Y., Chen, W., et al. (2013). JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Pineal Res.* 55, 275–286.

Yasuo, S., Yoshimura, T., Bartell, P.A., Iigo, M., Makino, E., Okabayashi, N., and Ebihara, S. (2002). Effect of melatonin administration on qPer2, qPer3, and qClock gene expression in the suprachiasmatic nucleus of Japanese quail. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1541–1546.

Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X., and Duan, S. (2007). Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 9, 945–953.

Zhdanova, I.V., Wurtman, R.J., Balcioglu, A., Kartashov, A.I., and Lynch, H.J. (1998). Endogenous melatonin levels and the fate of exogenous melatonin: age effects. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 53, B293–298.